Untersuchungen über die fermentative und nichtfermentative Oxydation des Rheinanthrons

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kurt Koßmann
aus Berlin

1963

Untersuchungen über die fermentative und nichtfermentative Oxydation des Rheinanthrons

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kurt Koßmann
aus Berlin

1. Referent: Priv. Doz. Dr. H. Loth

2. Referent: Prof. Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 3. 1963

Tag der Promotion: 9. Juli 1963

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. H. L o t h unter Mitwirkung von Herrn Professor Dr. G. S c h e n c k angefertigt.

Für seine Bereitschaft zur Diskussion der Probleme meiner Arbeit und für seine Hinweise beim Literaturstudium danke ich Herrn Privatdozent Dr. Helmut Loth, der auch die Bearbeitung des vorliegenden Themas anregte.

Herrn Professor Dr. Gerhard Schenck danke ich herzlich für die freundliche Unterstützung und das Interesse, das er meiner Arbeit und meiner wissenschaftlichen Fortbildung angedeihen ließ.

Der Firma Schering A.G., Berlin, bin ich für die Bereitstellung geeigneter Geräte für die Extraktion großer Drogenmengen und für die Aufnahme von IR-Spektren, der Firma Sandoz, Basel, für Proben an Sennosid A und B zu Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	7
DARSTELLUNG DER SUBSTANZEN	11
Darstellung von Rhein	11
Formulierung des Rheins	12
Bestimmung des Äquivalentgewichtes	12
Bestimmung des Molgewichtes	13
UV-Spektrum	13
IR-Spektrum	14
Darstellung von Rheinmethylester	15
Darstellung von Rheinanthron	15
Darstellung von Rheindianthron	16
Darstellung von Sennosid A	17
Darstellung von Sennidin A	19
BESCHREIBUNG DER VERSUCHSANORDNUNG	2o
Dihydroxyfumarsäure	2o
Meerrettichperoxydase	21
Wasserstoffperoxyd	22
Pufferlösungen	22
Butylazetat	23
Tetrahydrofuran	23
Spektralphotometer	23
Versuchsansätze	24
Papierchromatographie	24
Dünnschichtchromatographie	25
ERGEBNISSE	
Absorptionsspektren von Rheinanthron, Rheindianthron, Sennidin A und Rhein	26
Die Herstellung einer Rheinanthronlösung	28
Chromatographischer Nachweis der Oxydationsprodukte des Rheinanthrons	3o
Absorptionsspektren der Gemische der Reaktionsprodukte	32

Seite

Quantitative photometrische Bestimmung von Rhein neben Rheindianthron 35

Autoxydation des Rheinanthrons in verschiedenen pH-Bereichen 4o

Autoxydation des Rheinanthrons bei pH 6 43

Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd 45

Oxydation von Rheinanthron mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd in Gegenwart phenolischer Überträger 51

Reaktion des Rheinanthrons mit dem System Peroxydase-Wasserstoffperoxyd-Dihydroxyfumarsäure-Sauerstoff 53

Reaktion des Rheindianthrons mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd 63

Einwirkung von Peroxydase und Wasserstoffperoxyd auf Sennosid A 65

DISKUSSION 68

ZUSAMMENFASSUNG 76

LITERATURVERZEICHNIS 78

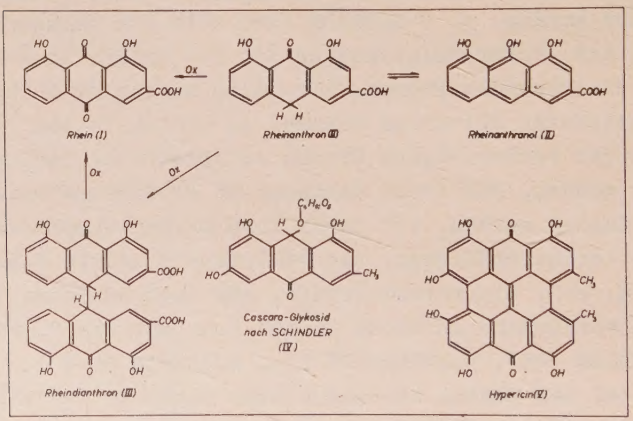
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548012_0039

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die in der Therapie als Laxantia verwendeten und auch in modernen Pharmakopöen aufgeführten Drogen Folia Sennae, Rhizoma Rhei, Cortex Frangulae und Cortex Cascarae sagradae sowie Aloe, enthalten als wirksame Substanzen verschiedene Anthraderivate.Unter dieser Sammelbezeichnung sind Abkömmlinge des 1,8-Dihydroxyanthrachinons und -anthrons wie auch des 1,8,1',8'-Tetrahydroxydianthrons in freier und glykosidisch gebundener Form zusammengefaßt.
Wie schon angedeutet, lassen sich neben Glykosiden und Aglykonen verschiedene Oxydationsstufen der aus den Drogen isolierten Anthraderivate unterscheiden. R.WASICKY (57) berichtete bereits 1915 über die jahreszeitlich unterschiedliche Zusammensetzung des Gemisches der Anthracenabkömmlinge in Rhabarberpflanzen, wobei im Frühjahr hauptsächlich reduzierte, im Herbst vorwiegend oxydierte Verbindungen beobachtet wurden. H. MÜHLEMANN (36) hält die reduzierten Anthron- bzw. Anthranolglykoside für die primär in der Pflanze entstehenden Formen, die durch Oxydation in höhere Oxydationsstufen übergehen können. In vielen Fällen sind auch aus den verschiedenen Drogen entsprechende Derivate isoliert worden. Daß freie Anthrone in Pflanzenmaterial nicht gefunden werden, ist durch ihre Oxydationsempfindlichkeit leicht erklärbar. Als stabilere Produkte sind dimere Formen, z.B. Dianthronderivate, und Anthrachinone in Pflanzen vorhanden. Anthrone finden sich nur als Glykoside (O.SCHINDLER (43), H.AUTERHOFF (3), W.SCHMID (44)).
Am Beispiel des Rheins sei auf einige mögliche Oxydationsstufen und isolierte Verbindungen eingegangen.
Rhein, 1,8-Dihydroxyanthrachinon-3-carbonsäure,wurde 1894 von O.HESSE (23) aus Rhabarberwurzeln isoliert. O.A.OESTERLE (38) klärte 1912 seine chemische Struktur, die später von A. STOLL (51), H.AUTERHOFF und F.C.SCHERFF (4) sowie H.NAWA, M.UCHIBAYASHI und T. MATSUOKA (37) bestätigt wurde (I). Rheinmono- und -diglukosid konnten von A.C.BELLAART (5) bzw. L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und H.J. LEUE (25) nachgewiesen werden, während es neuerdings J.K. CRELLIN,

J.W.FAIRBAIRN, C.A.FRIEDMANN und H.A.RYAN (13) gelang, aus Sennesblättern ein Rhein-8-glukosid zu isolieren. Ebenfalls aus Sennesblättern wurde von den gleichen Autoren das Rheinanthron-8-glukosid und von A.STOLL, B.BECKER und W.KUSSMAUL (53) die Glukoside Sennosid A und B, die Rheindianthronderivate darstellen, erhalten.
Die Aglykone der reduzierten Stufen sind aus pflanzlichem Material bisher nicht isoliert worden, sind aber partialsynthetisch - Rheinanthron (II) aus Rhein nach E.J.CROSS und A.G.PERKIN (14), Rheindianthron (III) aus Rheinanthron nach A.STOLL, B.BECKER und A.HELFENSTEIN (52), sowie nach H.AUTERHOFF und F.C.SCHERFF (4) - zugänglich. Beide Aglykone können durch geeignete Oxydationsmittel wieder in Rhein übergeführt werden (52).



Ein Derivat des Rheins in der Oxanthron- bzw. Anthrahydrochinonstufe ist nicht bekannt, doch konnte O.SCHINDLER (43) ein entsprechendes Derivat eines Emodinglykosides (IV) aus der Cascara sagrada - Rinde beschreiben. Darüber hinaus sind in der Natur noch dimere Anthracenabkömmlinge, die Dehydrierungsprodukte von 1,6,8-Tri-

hydroxyanthronen darstellen, vorhanden. Als Beispiel sei das von H.BROCKMANN und Mitarbeitern (8) isolierte und vom gleichen Arbeitskreis (7,9) synthetisierte Hypericin, ein Mesonaphthodianthronkörper (V), erwähnt.

Im Folgenden wird bei Erwähnung der tautomeren Anthron-Anthranolstufe immer vom Anthron die Rede sein, da dieses die stabilere Form darstellt, das Gleichgewicht auch in Lösung auf Seiten des Anthrons liegt und erst durch Alkali eine stärkere Enolisierung eintritt (35). Damit soll aber nicht ausgedrückt werden, daß das Anthron auch das an den untersuchten Reaktionen beteiligte Tautomere ist.
Das dimere, an der Verknüpfungsstelle der beiden Ringsysteme (1o und 1o') hydrierte Anthron wird in Anlehnung an neuere Arbeiten von G.KORTÜM, W.THEILACKER und E.ELLIEHAUSEN (30), H.AUTERHOFF und F.C.SCHERFF (4) sowie von L.HÖRHAMMER, H.WAGNER und I.KÖHLER (24) mit der von O.DIMROTH (17) vorgeschlagenen Nomenklatur als Dianthron bezeichnet. In Arbeiten von R.SCHOLL und J.MANSFELD (46), A.STOLL, B.BECKER und W.KUSSMAUL (53) und älteren Veröffentlichungen H.BROCKMANNs (8) findet sich für das gleiche Ringsystem die Bezeichnung Dihydrodianthron.

Als pharmakologisch wirksame Form wird heute die Anthronstufe angesehen (W.SCHMID (45), H.IPPEN und T.MONTAG (26)), doch ist auch bekannt, daß Anthrone stark brechenerregend und schleimhautreizend wirken, weshalb vom DAB 6 für Faulbaumrinde eine einjährige Lagerzeit nach der Ernte vorgeschrieben ist, um die in der frisch geernteten Droge fast ausschließlich vorhandenen Anthronglykoside in Anthrachinone, die diese unangenehmen Nebenwirkungen nicht haben, umzuwandeln.
Auf welchem Wege diese Oxydation verläuft, ist bisher nicht sicher bekannt. Ebenso unbekannt ist, auf welche Weise die primär in der Pflanze gebildeten Anthrone im noch intakten

intakten Organismus in die Dianthron- bzw. Anthrachinonstufe übergehen.
R.WASICKY und B.HEINZ (58) vermuteten eine enzymatische Oxydation der Anthrone. Spätere Untersuchungen von M.BRIDEL und C.CHARAUX (6) und O.E.SCHULTZ (47) ergaben keine Anhaltspunkte für eine oxydative Fermentwirkung, doch wurde eine Steigerung der Autoxydation nach Glykosidspaltung durch eine Glykosidase diskutiert.
G.SCHENCK, H.LOTH und F.D.FEYEN (41) konnten im Vergleich zur Autoxydation eine höhere Anthrachinonausbeute erhalten, wenn sie eine Frangulaperoxydasepräparation und Wasserstoffperoxyd auf ein Gemisch von Frangulaanthranolen einwirken ließen.

Diesen ersten empirischen Ergebnissen sollten nun Studien an einer Modellsubstanz, einem isolierten Anthronderivat, folgen. Es sollten Aussagen über die Oxydationsprodukte des Rheinanthrons (II), die nach Autoxydation in wässeriger Lösung bei verschiedenen pH - Werten und bei fermentativer Oxydation durch Peroxydase - Wasserstoffperoxyd unter verschiedenen Reaktionsbedingungen auftreten, erhalten werden. Aus diesen Versuchen ergab sich die Notwendigkeit, auch das Verhalten der dimeren Abkömmlinge des Rheinanthrons, des Rheindianthrons und des Glykosids Sennosid A, unter entsprechenden Bedingungen zu untersuchen.
Bei der Oxydation des Rheinanthrons zum Rhein war die Möglichkeit des Einflusses eines hydroxylierenden Systems auf diesen Vorgang zu berücksichtigen.
Als Vertreter der im Pflanzenreich weit verbreiteten Peroxydasen (22) wurde die leicht zugängliche Meerrettichperoxydase verwendet.

DARSTELLUNG DER SUBSTANZEN

Darstellung von Rhein

In Anlehnung an Vorschriften von L.HÖRHAMMER, H.WAGNER und I.KÖHLER (24) und H.AUTERHOFF und F.C.SCHERFF (4) wurden 4 kg Rhiz.Rhei (Rheum palmatum var.tanguticum) pulverisiert und mit 5o l 7o %igem Methanol unter Rühren zwei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Absetzen wurde die überstehende Flüssigkeit abgehebert und der Rückstand in gleicher Weise nochmals mit 3o l 7o %igem Methanol extrahiert. Nach Filtration und Auspressen des Drogenrückstandes wurden die vereinigten Extrakte mit 2o l 38 %iger Salzsäure versetzt und eine Stunde bei Siedetemperatur hydrolisiert. Danach wurde das Methanol im Vakuum bei 35° C abgedampft. Die verbleibenden 4o l wässerigen Rückstandes wurden viermal mit je 25 l Äther ausgeschüttelt, die gesammelten Ätherauszüge im Vakuum auf etwa 15 l eingeengt und bis zur neutralen Reaktion des Waschwassers mit destilliertem Wasser gewaschen. Die gesamte Äthermenge wurde dann dreimal mit je 4 l einer 5 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Zum Hydrogencarbonatextrakt wurde sofort Salzsäure in ausreichender Menge zugegeben, daß Rhein sogleich ausfiel. Der Niederschlag wurde aus einer Nutsche gesammelt und gründlich mit Wasser gewaschen. Es resultierte ein braunes Rohrhein. Die Gesamtausbeute betrug 13,5 g.

Das Rohprodukt wurde aus Pyridin umkristallisiert. Es wurden 7 g gelbes Rhein erhalten, das einer Vakuumsublimation unterworfen wurde (Sandbad 2oo - 23o° C, 15 mm Hg). Unter teilweiser Zersetzung des Sublimationsgutes wurden 2,5 g chromatographisch reines, orange-gelbes Rhein erhalten. Die Kristallnadeln schmolzen im Aluminiumblock bei 314° C (unkorrigiert), was gute Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Werten ergab: O.A.OESTERLE (38), R.ROBINSON und J.L.SIMONSEN (39),

A.C.BELLAART (5) geben 321 - 325° C an, H.AUTERHOFF und F.C.SCHERFF (4) 31o°, M.JACOB (27) 311 - 312°, I.KÖHLER (29) 316 - 319° und H.NAWA und Mitarbeiter (37) 318 - 319°C.

Formulierung des Rheins

Während unserer Untersuchungen erschien eine Mitteilung von L.HÖRHAMMER, H.WAGNER und I.KÖHLER (24), in der für das Rhein entgegen der bisherigen Auffassung eine Dehydrodianthronstruktur angenommen wurde. Da die Konstitution des Rheins für die Untersuchung der Oxydation des Rheinanthrons von großer Wichtigkeit ist, wurde es notwendig, das wie beschrieben erhaltene Rhein auf seine Molekülgröße hin zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden das Äquivalentgewicht durch acidimetrische Titration, das Molgewicht mit dem Dampfdruckosmometer und die Lage und Stärke der Absorptionsbanden im UV - und IR-Spektrum bestimmt. Die dabei erhaltenen, nachstehend wiedergegebenen Ergebnisse stimmen mit den Angaben von H.AUTERHOFF und F.C.SCHERFF (4) sowie von H.NAWA u.a. (37) überein. Diese Autoren haben inzwischen die alte Auffassung von der Anthrachinonstruktur des Rheins bestätigt.

a) Bestimmung des Äquivalentgewichtes.+)

Bei der Titration des Rheins diente ein Tetrahydrofuran-Wasser 5:1 (v/v) - Gemisch als Lösungsmittel, die Endpunktsanzeige erfolgte potentiometrisch.
Mit n/lo NaOH wurden zwei Stufen mit pK-Werten von 5,4 und lo,1 erfaßt. Schon der große Unterschied der Dissoziationskonstanten deutet darauf hin, daß hier nicht zwei symmetrisch angeordnete Carboxylgruppen, sondern nur eine Carboxylgruppe und ein phenolisches Hydroxyl titriert worden ist. Ein pK-Wert von lo entspricht der Acidität

+) Den Herren Dr.Neudert und Dr.Cleve von der Schering AG, Berlin, danke ich für die Durchführung der Bestimmung und die Aufnahme der IR-Spektren.

einer phenolischen OH-Gruppe. Die zweite Phenolgruppe wird nicht mehr erfaßt.
Titration: 29,47 mg Rhein verbrauchten in der ersten Stufe 1,o46 ml n/1o NaOH (Äquiv.281,7), in der zweiten Stufe 1,o49 ml (Äquiv.28o,9). Der Gesamtverbrauch von 2,o95 ml n/1o NaOH entspricht einem Äquivalentgewicht von 14o,7. Bei der Rücktitration mit n/1o HCl wurden 1,o36 und 1,o41 ml verbraucht (Äquiv. 284,5 und 283,1). Gesamtverbrauch 2,o77 ml n/1o HCl (Äquiv. 141,9).

Das berechnete Äquivalentgewicht für 1,8-Dihydroxyanthrachinon-3-carbonsäure beträgt 284 (bzw.142), für 1,8,1',8'-Tetrahydroxydehydrodianthron-3,3'-dicarbonsäure dagegen 268 (bzw.134).

b) Bestimmung des Molgewichtes

Zur Molgewichtsbestimmung wurde der Rheinmethylester hergestellt. Die Ermittlung des Molgewichtes erfolgte mit dem Dampfdruck-Osmometer der Fa. Mechrolab.
Dazu wurden 8,25 mg Rheinmethylester in 4,54 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst, was einer Einwaage von 1,82 g Ester in 1 ooo,o ml Lösungsmittel entspricht. Hierfür wurde eine Molarität von o,oo63 ermittelt. Daraus ergibt sich ein Molgewicht von 289. Das berechnete Molgewicht des Rheinmethylesters beträgt 298.

c) UV-Spektrum

Das UV-Spektrum des Rheins in Methanol ergab gute Übereinstimmung mit den Daten von H.NAWA (37). Es zeigte Absorptionsmaxima bei 23o,258 und432 nm,eine Schulter bei 282 nm.

NAWA	ϵ [Liter/Mol.cm]	eigene Werte	ϵ[Liter/Mol.cm]
229 nm	36 8oo	23o nm	39 8oo
258 nm	2o 1oo	258 nm	2o 6oo
435 nm	11 1oo	432 nm	11 7oo

Tab.1: Molare Extinktionskoeffizienten von Rhein in Methanol.

d) IR-Spektrum

Das IR-Spektrum des Rheins in KBr zeigte eine Carboxylbande bei 1700 cm^{-1} (H. NAWA 1701 cm^{-1}) und eine durch chelierte Carbonylfunktionen erzeugte Bande bei 1630 cm^{-1} (H.NAWA 1637 cm^{-1}). Auch die IR-Spektren des Rheins nach F.C.SCHERFF (42), I.KÖHLER (29) und P.SERGER (48) weisen nur je eine Carbonylbande auf.
Nach Veresterung tritt eine zweite, nicht chelierte Carbonylfunktion in Erscheinung, was auch die Spektren des Rheinmethylesters von H.NAWA (37) und des "Monorheins" von I.KÖHLER (29) bestätigen. Die nicht chelierte Carbonylgruppe erzeugt eine Bande bei 1675 cm^{-1} (H.NAWA 1684 cm^{-1}).

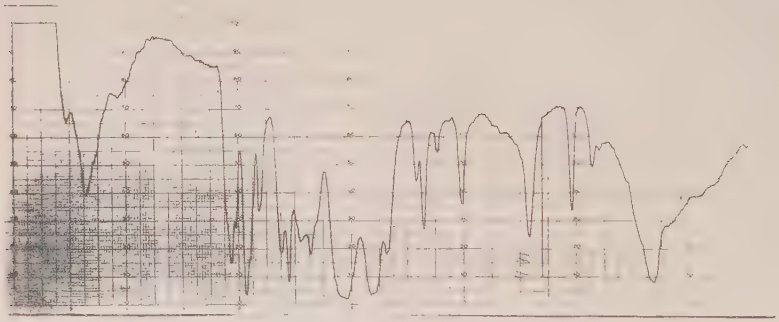


Abb.1: Infrarotspektrum des Rheins in KBr.

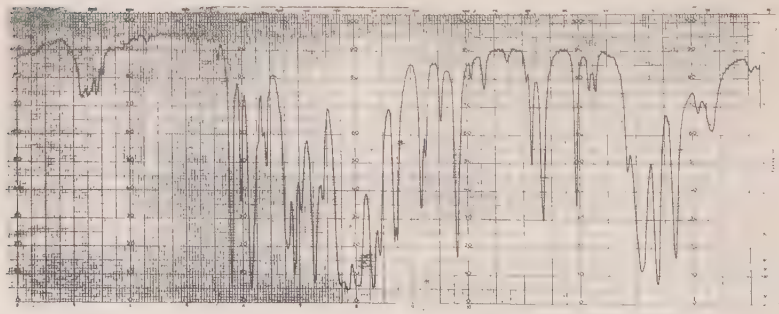


Abb. 2: Infrarotspektrum des Rheinmethylesters in KBr.

Darstellung von Rheinmethylester

Nach R.ROBINSON und J.L.SIMONSEN (39) wurden loo mg Rhein 8 Stunden mit 5o ml Methanol und 5 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure gekocht, nach Wasserzusatz zwei Tage stehengelassen, dann die ausgeschiedenen Kristalle abfiltriert und mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (1:2) gewaschen. Nach dem Trocknen über Phosphorpentoxyd wurden 71 mg eines mit Rhein verunreinigten Rheinmethylesters erhalten. Fp 174° C im Aluminiumblock.
Die Analyse erfolgte papierchromatographisch, absteigend mit wassergesättigtem Butanol als Fließmittel. Rf-Werte: Rhein o,5; Rheinmethylester o,84.
Das so erhaltene Produkt wurde zur Entfernung des Rheins in Äther gelöst und fünfmal mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die Ätherphase wurde dann mit Natriumsulfat getrocknet, der Äther abgedampft und der Rückstand aus 3o ml Eisessig umkristallisiert. Es wurden 39 mg Rheinmethylester, der sich papierchromatographisch als einheitlich erwies (Nachweisgrenze des Rheins etwa 10^{-6} g in der hundertfachen Estermenge), vom Schmelzpunkt 176 - 178° C erhalten.
Literaturwerte: R.ROBINSON und J.L.SIMONSEN (39), H.AUTERHOFF und F.C. SCHERFF (4), H.NAWA u. Mitarb. (37) 174° C.

Darstellung von Rheinanthron

Rheinanthron wurde nach E.J.CROSS und A.G.PERKIN (14) dargestellt. 1,2 g Rhein wurden in 24o ml Eisessig durch Erwärmen am Rückfluß gelöst, 45 ml einer 4o %igen Lösung von Zinn-II-chlorid in 38 %iger Salzsäure zugegeben und zwei Stunden am Sieden erhalten. Nach dem Erkalten trat Kristallisation ein. 2o Stunden später wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und die Kristalle getrocknet. Dabei wurden 9oo mg orange-brauner Kristallnadeln von Rheinanthron erhalten.

Dieses Rohprodukt wurde in 2oo ml Eisessig im Stickstoffstrom unter Erwärmen gelöst und nach Zusatz von 5 g Aktivkohle filtriert. Nach der Kristallisation wurde abgesaugt, ausgewaschen und über Phosphorpentoxyd getrocknet. Es resultierten 793 mg fein durchscheinende Nadeln von orange-gelber Farbe. Ein wohldefinierter Schmelzpunkt war nicht zu erhalten. Die Substanz zersetzte sich unter Verkohlung zwischen 26o und 28o° C, was den Literaturangaben entsprach: F.C.SCHERFF (42) 285°, M.JACOB (27) und P.SERGER (48) 26o - 28o°.

Die Vakuumsublimation (15 mm) bei 16o - 18o° C ergab eine hellgelbe Substanz, die ebenfalls bei 26o-28o° verkohlte. Sie enthielt aber Anthrachinonbestandteile, was durch sofort eintretende Rotfärbung mit methanolischer Kalilauge nachgewiesen wurde. Aus diesem Grunde mußte auf diese Möglichkeit der Reinigung des Anthrons verzichtet werden.

Darstellung von Rheindianthron.

Mit der von H.AUTERHOFF und F.C.SCHERFF (4,42) beschriebenen Darstellungsmethode für Rheindianthron konnte kein reines Produkt erhalten werden, so daß die Arbeitsweise etwas modifiziert wurde.
5oo mg Rheinanthron wurden in 1oo ml siedendem Eisessig im Stickstoffstrom und unter Lichtausschluß gelöst. Dann wurden innerhalb von 3o Minuten 5oo mg $FeCl_3.6\ H_2O$ in 1o ml Eisessig zugetropft. Nach der Zugabe von 2o ml Wasser wurde 24 Stunden im Dunkeln stehen gelassen. Darauf wurden die ausgeschiedenen gelbbraunen Flocken abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Es wurde eine grüne Substanz erhalten, die bei der absteigenden Papierchromatographie mit 5o %igem Methanol große Anteile am Startpunkt zurückbleibender Stoffe, die kein Rheindianthron darstellten, erkennen ließ. Daneben war noch Rheinanthron vorhanden.

Das Substanzengemisch wurde nun mit 2oo ml Methanol, 5o ml Wasser und 2o ml Äther durch einstündiges Kochen am Rückfluß extrahiert. Die unlöslichen, grünen Bestandteile wurden abfiltriert, das Filtrat nach dem Einengen mit Wasser und Eisessig versetzt und nach mehrstündigem Stehen bei 2° C unter Lichtausschluß abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet. Es resultierte eine gelbe, pulvrig - amorphe Substanz. (31 mg). Der Schmelzpunkt blieb uncharakteristisch, Zersetzung trat ab 26o° C ein. F.C.SCHERFF (42) gibt Verkohlung oberhalb von 3oo° an.
Die Identität der Substanz wurde durch Papierchromatographie nachgewiesen. Danach war das Rheindianthron einheitlich und zeigte gleiche Rf-Werte wie Sennidin A, dessen UV-Spektrum dem des Rheindianthrons ebenfalls entsprach (s.S.26).

Darstellung von Sennosid A

Die Herstellung des Sennosids A erfolgte nach der Vorschrift von A.STOLL, B.BECKER und W.KUSSMAUL (53) aus Sennesblättern (Cassia angustifolia).
Dazu wurden 2 kg Drogenpulver einer viermaligen Vorextraktion mit je 7 l eines Gemisches aus 93 Teilen Chloroform und 7 Teilen Äthanol zur Entfernung von Chlorophyll und anderen fettlöslichen Substanzen unterworfen. Die Droge wurde mit dem Lösungsmittel jedesmal 2o Minuten geschüttelt, abgenutscht und mit einem Liter des angegebenen Gemisches nachgewaschen.
Nach der Vorbehandlung wurde das Pulver viermal mit je 7 l einer Lösung von 4o g Oxalsäure in 32 l Methanol durch jeweils zweistündiges Schütteln extrahiert und mit je einem Liter dieser Lösung nach dem Abnutschen gewaschen. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum bei 3o° C auf ein Volumen von 4 l eingeengt. Nach 24 Stunden war nur ein sehr geringer Teil des zu erwartenden Rohsennosids A ausgefallen. Daher wurde eine dreimalige Nachextraktion

des Drogenrückstandes mit je 4 l Methanol, das 1o ml Triäthylamin pro Liter Methanol enthielt, vorgenommen.

Die so erhaltenen Extrakte wurden im Vakuum auf ein Volumen von einem Liter eingedampft und bis zur stark sauren Reaktion (pH 1 - 2) mit methanolischer Bromwasserstoffsäure, 1o ml 48 %iger wässeriger Bromwasserstofflösung auf 9o ml Methanol, versetzt, wobei sofort ein Niederschlag von Rohsennosid A ausfiel. Insgesamt 3,1 g gesammeltes Rohkristallisat wurden im Porzellanmörser mit einem Gemisch von 3o ml Methanol und 3 ml Triäthylamin verrieben, abgesaugt und das Filtrat mit methanolischem Bromwasserstoff angesäuert. Auf diese Weise wurden 2,2 g eines gelben Sennosids A gewonnen, das durch Umkristallisation aus Aceton - Wasser (3:2, v/v) 1,6 g papierchromatographisch (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5) reines Sennosid A lieferte.
Die gelben Kristallplatten hatten keinen definierten Schmelzpunkt. Bei 23o° C begann die Verkohlung, bei 26o° war die Substanz vollständig zersetzt (Kofler-Heizblock). STOLL und Mitarbeiter geben 2oo - 24o° C an (53).

Hydrolyse: Das eingewogene Sennosid A wurde jeweils in 2 ml Wasser suspendiert, mit einigen Kristallen Natriumhydrogencarbonat in Lösung gebracht und mit 8 ml n/1 HCl versetzt. Nach achtstündigem Erwärmen im Wasserbad wurde das abgeschiedene Aglykon auf einer Glasfritte G 4 abgesaugt und nach dem Waschen mit Wasser in der Trockenpistole bei 8o° C und 15 mm Hg drei Stunden über Phosphorpentoxyd getrocknet.
Molgewicht des Sennosids A = 862,5; Molgewicht des Aglykons ist 538. Der berechnete Aglykonanteil beträgt 62,4 %.
52,8 mg Sennosid A ergaben 33,2 mg = 62,8 % Aglykon
59,6 mg Sennosid A ergaben 37,9 mg = 63,5 % Aglykon.

Darstellung von Sennidin A

Da die von A.STOLL, B.BECKER und W.KUSSMAUL (53) angegebene Methode zur Hydrolyse der Sennaglykoside keine ausreichend sauberen Präparationen lieferte, wurde zur Darstellung von Sennidin A ein modifiziertes Verfahren gewählt.
6o mg Sennosid A wurden in 2 ml Wasser suspendiert, mit wenig Natriumhydrogencarbonat gelöst und 8 ml n/1 HCl zugegeben. Dann wurde 8 Stunden im Wasserbad unter strömendem Stickstoff erwärmt. Nach der Filtration des ausgeschiedenen Niederschlages wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet und gewogen. Ausbeute 35 mg Sennidin A = 93 % d.Th. Die Substanz zersetzte sich über 280° C.

Die Säurehydrolyse der Sennoside brachte fast immer sehr schlechte Ergebnisse. Zusatz von Schwefelsäure in Konzentrationen zwischen 5 und 4o % als Säurekomponente zu Hydrolyseansätzen im zugeschmolzenen Glasröhrchen bei Temperaturen von 5o bis 1oo° C lieferte grüne und braune Produkte. Eine Umkristallisation gelang nicht. Die Ergebnisse waren nicht reproduzierbar. Selbst die oben angegebene Salzsäurehydrolyse unter Stickstoff führte nicht immer zu einheitlichen Produkten.
Aus einer von der Fa.Sandoz,Basel, zur Verfügung gestellten Probe an Sennosid B ließ sich in keinem Fall reines Sennidin B gewinnen.

Das wie beschrieben gewonnene Sennidin A wurde durch sein UV-Spektrum charakterisiert (s.S.26) und war papierchromatographisch einheitlich (absteigend, 5o %iges Methanol).

BESCHREIBUNG DER VERSUCHSANORDNUNG

Dihydroxyfumarsäure

Wasserfreie Dihydroxyfumarsäure der Fa.Fluka, Buchs Schweiz, mit einem Zersetzungspunkt von 143° C wurde aus Aceton umkristallisiert. Nach dem Trocknen in der Trockenpistole bei 8o° und Wasserstrahlpumpenvakuum hatte die Substanz einen Zersetzungspunkt von 154 - 155° C im Aluminiumblock, was der Angabe von FENTON (19) entsprach.

Das UV-Spektrum der Dihydroxyfumarsäure (Abb.3) und ihrer Oxydationsprodukte, die bei der Reaktion mit Wasserstoffperoxyd bzw. mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd resultierten, ergaben keine Absorption im Bereich zwischen 36o und 45o nm. Das Maximum bei 292 nm verschwindet bei der Oxydation vollständig. In Wasser wurde für Dihydroxyfumarsäure bei 292 nm ein molarer Extinktionskoeffizient von ε = 895o ermittelt. H.S. MASON (33) gibt ε_{292} = 889o, E.F.HARTREE (21) ε_{292} = 9ooo an. (ε in Liter/Mol.cm)

Zu allen Versuchen wurden Lösungen der Dihydroxyfumarsäure frisch angefertigt.

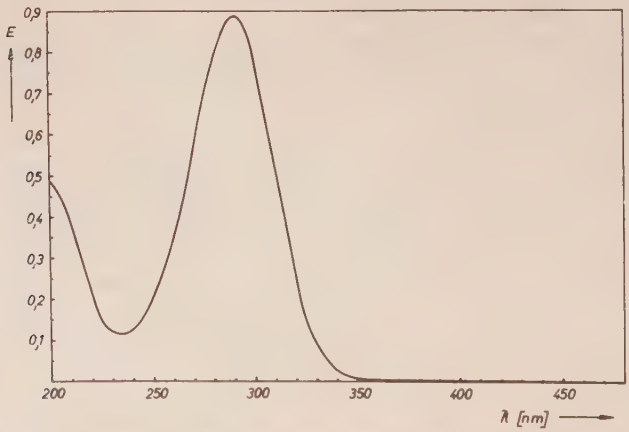


Abb. 3: Absorptionsspektrum von 1,465 mg Dihydroxyfumarsäure (Molgew.148) in loo,o ml Wasser.

Meerrettichperoxydase

Es wurde eine Meerrettichperoxydase der Fa. Boehringer, Mannheim, verwendet. Für alle Untersuchungen wurde eine Stammlösung von 10,0 mg Peroxydase in 10,0 ml Wasser hergestellt und davon jeweils 1,0, 0,5 oder 0,1 ml zu 100 ml Reaktionslösung gegeben.
Die Aktivitätsbestimmung wurde nach der Guajakolmethode von T.M.DEVLIN (16) durchgeführt.
Dazu werden 0,03 ml Fermentlösung (0,5 mg Peroxydase/ 10,0 ml Wasser) in einer Küvette mit 0,05 ml 0,02 m frisch bereiteter Guajakollösung und 2,9 ml m/100 Phosphatpuffer pH 7 gemischt. Im Spektralphotometer wird die Extinktion bei 470 nm gemessen. Dann werden 0,02 ml 0,04 n Wasserstoffperoxydlösung zugesetzt. Es wird die Zeit bis zur Erhöhung der Extinktion um 0,050 gemessen. Die Reaktion wird bei 25° C ausgeführt.
Für die angegebene Peroxydasekonzentration ergab sich eine Zeit von 20,1 Sekunden zur erforderlichen Extinktionserhöhung.

Bei der durchgeführten Reaktion ist die Oxydation des Guajakols durch den Peroxydase-Wasserstoffperoxyd-Komplex bei den gewählten Konzentrationen geschwindigkeitsbestimmend. Die Berechnung der Fermentkonzentration erfolgt nach der von B.CHANCE (11) angegebenen Gleichung:

$$e \approx \frac{1}{k_4 \cdot a_o} \cdot \frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{68{,}4}{\Delta t} \cdot 10^{-9} \text{ Mol/Liter}$$

e = Enzymkonzentration in Mol/Liter

$k_4 = 3{,}3 \cdot 10^{5} \text{Mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (bei 25°C) = Geschwindigkeitskonst.

$a_o = 3{,}33 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter = Anfangskonzentration des Guajakols

$\Delta x = 7{,}52 \cdot 10^{-6}$ Mol/Liter = Änderung der Wasserstoffperoxydkonzentration während der Messung. Sie entspricht einer gebildeten "Tetraguajakol"-Konzentration, die eine Extinktionserhöhung um 0,050 hervorruft. (T.M. DEVLIN (16)).

Inzwischen konnte B.C. SAUNDERS (4o) nachweisen, daß bei der Oxydation des Guajakols durch Peroxydase und H_2O_2 nicht Tetraguajakol, sondern ein Gemisch oxydierter Tetrahydroxydiphenylmethyläther entsteht. Die Gültigkeit der Aktivitätsbestimmung wird dadurch aber nicht beeinflußt.

Δt = für die Erhöhung der Extinktion um o,o5o benötigte Zeit in Sekunden

Aus der angegebenen Gleichung ergibt sich für Δt = 2o,1 Sekunden eine Peroxydasekonzentration von $3{,}4.1o^{-9}$ Mol/l, die einer Einwaage von o,5 mg Peroxydase entspricht. 1 mg Trockensubstanz enthält daher $6{,}8.1o^{-9}$ Mol aktive Peroxydase.

Wasserstoffperoxyd

Aus Perhydrol p.a."Merck" wurde eine m/1o Wasserstoffperoxydlösung hergestellt, deren Gehalt von Zeit zu Zeit mit n/1o Kaliumpermanganatlösung bestimmt wurde. Die Lösung wurde vor Licht geschützt bei o - 2^{o} C aufbewahrt. Dieses Konzentrat wurde für die einzelnen Versuche entsprechend verdünnt.

Pufferlösungen

Als Pufferlösung dienten bei pH 5 - 8 ein Citronensäure-Phosphat-Gemisch nach MC ILVAINE (15), bei pH 9 - 1o ein Ammoniak-Ammoniumchlorid-Gemisch (15). Der pH der Lösungen wurde durch Messung mit der Glaselektrode kontrolliert und auf $\pm$ o,1 Einheit eingestellt.
Wenn nicht anders angegeben, wurden 5o ml o,1 m Pufferlösung in 1oo ml Reaktionslösung verwendet.

Butylazetat

Für spektrophotometrische Messungen wurde das Butylazetat nach den Angaben von M. JACOB (27) gereinigt.

n-Butylazetat wurde mit Sodalösung neutralisiert, über Calciumchlorid getrocknet, filtriert und destilliert, wobei das erste Drittel des Destillates verworfen wurde. Kp 123 - 125° C.

Tetrahydrofuran

Um ein peroxydfreies Tetrahydrofuran als Lösungsmittel für das Rheinanthron zu erhalten, wurde es unmittelbar vor jedem Versuch folgender Behandlung unterworfen (6o): Auf ein 15 mm weites Chromatographierohr, das mit 25 g Aluminiumoxyd basisch "Woelm", Aktivitätsstufe I, gefüllt war, wurden 3o ml Tetrahydrofuran gegeben. Die zuerst abtropfenden 1o ml wurden verworfen, das restliche ablaufende Tetrahydrofuran war wasser- und peroxydfrei. Die Prüfung auf Peroxyde erfolgte mit Vanadin-Schwefelsäure, die keine Färbung beim Versetzen mit dem so erhaltenen Tetrahydrofuran zeigte.

Spektralphotometer

Die Messungen wurden mit einem Spektralphotometer der Fa.Carl Zeiss, Modell PMQ II, in Quarzküvetten mit eingeschliffenem Stopfen und einer Schichtdicke von 1,ooo cm ausgeführt.
Zur Aufnahme des Absorptionsspektrums des Rheinanthrons diente ein selbstregistrierendes Gerät der Fa.Beckman, Modell DK - 1 A.
Definition verwendeter Begriffe: ε = molarer Extinktionskoeffizient in Liter/Mol.cm. $E_{1cm}^{1\%}$ und $E_{1cm}^{1mg\%}$ sind die Extinktionen bei Konzentrationen von 1 g bzw. 1 mg pro loo,o ml Lösungsmittel und 1 cm Schichtdicke.

Versuchsansätze

Für die Untersuchung der fermentativen und der nichtfermentativen Oxydation des Rheinanthrons wurde folgende Zusammensetzung der Reaktionsansätze gewählt:
Etwa 5.10^{-6} Mol (=1,35 mg) Rheinanthron wurden in 1,0 ml peroxydfreiem Tetrahydrofuran gelöst. Die Lösung wurde mit 50,0 ml 0,1 m Pufferlösung gemischt.
Je nach Versuchsansatz wurden dann variierende Konzentrationen an Wasserstoffperoxyd und Peroxydase zugegeben. Weitere Reaktionsteilnehmer, wie Dihydroxyfumarsäure, Askorbinsäure, Brenzkatechin oder Mangan-II-chlorid wurden in wässeriger Lösung zugesetzt.
Schließlich wurde mit Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt.

Die Reaktionsansätze wurden dunkel gestellt. Nach den jeweils angegebenen Versuchszeiten wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 - 20 ml 10 %iger Salzsäure und drei- bis viermaliges Ausschütteln mit je 20 ml gereinigtem Butylazetat unterbrochen. Die Extrakte wurden gesammelt, mit Natriumsulfat getrocknet und mit Butylazetat auf 100,0 ml aufgefüllt.
Von dieser Lösung wurden die Extinktionen bei 380 und 430 nm im Spektralphotometer gemessen.

Papierchromatographie

Zur Identifizierung der Oxydationsprodukte des Rheinanthrons wurde folgende Versuchsanordnung eingehalten:
100,0 ml der oben erhaltenen Butylazetatlösung wurden in einem Büchi-Rotationsverdampfer im Vakuum bei 30° C auf 10,0 ml eingeengt. 0,2 bis 0,4 ml des Konzentrats wurden neben Testsubstanzen auf Whatman I Papier (58 x 16 cm) aufgetragen.
Nach dreistündiger Sättigung mit 50 %igem Methanol wurde in geschlossenen Glaskammern (12) absteigend mit

5o %igem Methanol entwickelt. Die Laufzeit betrug 8 Stunden, die Laufstrecke etwa 35 cm.
Zur Sichtbarmachung der Flecken diente eine UV-Lampe (Wellenlänge 366 nm). Als Sprühreagentien wurden 5 %ige methanolische Kalilauge für Anthrachinone und Dianthrone, o,1 %ige p-Nitrosodimethylanilinlösung in Pyridin für Anthrone (56) verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung der Oxydationsprodukte des Rheinanthrons erfolgte nach Auftragen von o,o2 bis o,o4 ml des unter "Papierchromatographie" beschriebenen Konzentrats auf Platten mit Kieselgel G "Merck" als Träger.
Als Fließmittel diente Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure 5:4:1 (v/v/v) über eine Laufstrecke von lo cm während 2o Minuten in gesättigter Glaskammer.
Die Detektion war analog den Papierchromatogrammen.

ERGEBNISSE

Absorptionsspektren von Rheinanthron, Rheindianthron, Sennidin A und Rhein. (250 - 500 nm)

Für die photometrischen Untersuchungen erwies sich Butylazetat als geeignetes Lösungsmittel. Daher wurden auch die Absorptionsspektren von Rheinanthron, Rheindianthron, Sennidin A und Rhein im Bereich von 250 bis 500 nm im gleichen Solvens aufgenommen. M.JACOB (27) verwendete Butylazetat bereits als Lösungsmittel für Rheinanthron.

Zur Aufnahme der Spektren wurden die Substanzen drei Stunden in der Trockenpistole (80° C, 15 mm) über Phosphorpentoxyd getrocknet und nach dem Abkühlen eingewogen. Das Lösungsmittel wurde schwach erwärmt und nach dem Abkühlen auf 20° C wurde auf 100,0 ml aufgefüllt.

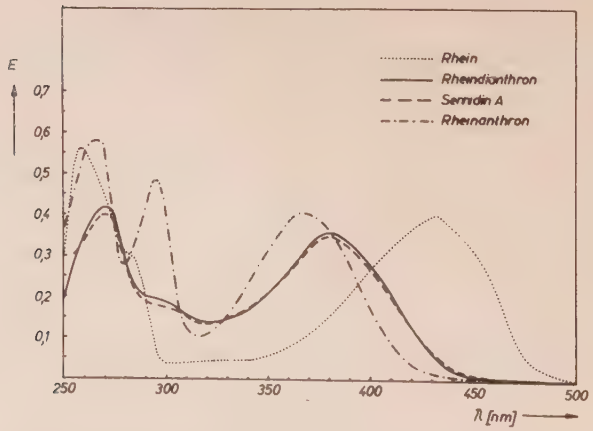


Abb. 4: Absorptionsspektren von Rhein, Rheindianthron, Sennidin A und Rheinanthron in Butylazetat berechnet auf eine Einwaage von je 1,00 mg/100,0 ml Lösung.

Die Spektren von Rhein, Rheindianthron und Sennidin A (Abb. 4) wurden in einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II in 1,000 cm Quarzküvetten aufgenommen. Die in Tabelle 2 angegebenen Extinktionen und Extinktionskoeffizienten stellen bei Rhein und Rheindianthron Mittelwerte aus je fünf, bei Sennidin A aus zwei Messungen dar.
Das Spektrum des Rheinanthrons ist das Ergebnis einer Messung. Da diese Substanz einer erheblichen Autoxydation unterliegt, verändert sich ihre Absorption rasch. Die vorliegenden Werte wurden 23 Minuten nach Beginn des Lösungsvorgangs in Butylazetat im selbstregistrierenden Beckman-Spektralphotometer Dk-- 1 A in 1,000 cm Quarzküvetten erhalten (Abb.4,Tab.2).

	Max λ [nm]	Min	$E^{1\%}_{1cm}$	Molgew.	ε [Liter/Mol.cm]
Rheinanthron	267	279	580	270	15 660
	295		487		13 160
	365	315	405		10 950
Rheindianthron	271	320	420	538	22 600
	380		362		19 450
Sennidin A	271	320	405	538	21 800
	380		352		18 900
Rhein	259	300	565	284	16 050
	432		401		11 400

Tab. 2: Spezifische Extinktionen und molare Extinktionskoeffizienten in den Absorptionsmaxima von Rheinanthron, Rheindianthron, Sennidin A und Rhein in Butylazetat.

Die Herstellung einer Rheinanthronlösung

Um die fermentative Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd untersuchen zu können, war es notwendig, die Substanz in einem wässerigen System in Lösung zu halten. Es war zu beachten, daß bei einer Fermentreaktion keine hohen Konzentrationen an organischen Lösungsmitteln vorhanden sein durften. Im Idealfall sollten organische Solventien überhaupt fehlen. Für die photometrischen Bestimmungen war es notwendig, daß etwa 5.10^{-6} Mol (=1,35 mg) Rheinanthron pro 100 ml Reaktionsansatz gelöst sein mußten, um ausreichend große Extinktionen zu erhalten.
Es wurde festgestellt, daß die Löslichkeit des Rheinanthrons in wässerigen Puffersystemen vom pH 3 - 5 zu gering war. Dabei wurden verschiedene Puffer in Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,1 m verwendet: Azetat- und Phosphatpuffer nach MICHAELIS (50) und Citronensäure - Phosphat - Puffer nach MC ILVAINE (15). Auch bei Zusatz von diesen sauren Pufferlösungen zu Rheinanthronlösungen in organischen Solventien trat nach kurzer Zeit eine Ausfällung des Anthrons ein.
Rein wässerige Lösungen des Rheinanthrons vom pH 6 ließen sich ebenfalls nicht herstellen. So war es nicht zu vermeiden, ein Gemisch aus einem mit Wasser unbegrenzt mischbaren organischen Lösungsmittel und einer wässerigen Pufferlösung zu verwenden. Aceton, Methanol und Äthanol erwiesen sich als ungeeignet, da die erforderlichen Mengen zu groß waren und beim Mischen mit pH 6 Puffer das Anthron ausfiel.
Gut löste sich Rheinanthron in Tetrahydrofuran, dessen starke Neigung zur Peroxydbildung sehr nachteilig ist. Da aber kein besseres Solvens gefunden werden konnte, wurden schließlich die ungünstigen Eigenschaften in Kauf genommen, zumal schon 1 ml Tetrahydrofuran genügte, um 1,35 mg Rheinanthron in 100 ml 0,05 m Citronensäure-

Phosphat-Puffer vom pH 6 in Lösung zu halten.
Zur Herstellung einer Rheinanthronlösung wurde das Tetrahydrofuran unmittelbar vorher an basischem Aluminiumoxyd "Woelm" Aktivitätsstufe I peroxydfrei gemacht. Darauf erfolgte die Zugabe des Rheinanthrons. Der Lösungsvorgang war nach lo Minuten beendet und erfolgte unter Lichtausschluß. Das Rheinanthron löste sich mit gelber Farbe. Danach wurde sofort mit wässeriger Pufferlösung verdünnt. Aus der nun zunächst fast farblosen Mischung fiel Rheinanthron nicht mehr aus.

Die chromatographische Untersuchung sämtlicher angefertigter Lösungen des Rheinanthróns deutete auf eine sehr rasche Autoxydation. In allen verwendeten Lösungsmitteln konnte schon nach kurzer Zeit Rheindianthron nachgewiesen werden (s.S.3o).

Chromatographischer Nachweis der Oxydationsprodukte des Rheinanthrons

Die bei der Autoxydation und bei der fermentativen Oxydation des Rheinanthrons auftretenden Oxydationsprodukte konnten durch Papier- und Dünnschichtchromatographie zum Teil identifiziert werden.
Unter verschiedenen Reaktionsbedingungen, die später einzeln beschrieben werden, wurden Gemische von Oxydationsprodukten erhalten, die chromatographisch aufgetrennt wurden. In fast allen Fällen wurden Rheindianthron und Rhein nachgewiesen. Bei einigen Reaktionsansätzen traten auch braune Folgeprodukte, Polymere oder Dehydrierungsprodukte des Rheindianthrons, auf. Sie wurden nicht näher identifiziert. Auch eine chromatographische Charakterisierung dieser Stoffe war nicht möglich, da sie mit allen untersuchten Fließmitteln am Startpunkt zurückblieben. Neben Rheindianthron und Rhein wurden keine anderen Oxydations- oder Hydroxylierungsprodukte des Rheinanthrons gefunden, die sich beim Entwickeln vom Startfleck lösten. Das Dianthron- und das Anthrachinonderivat konnten durch mitlaufende Testsubstanzen erkannt werden.

Bei der Papierchromatographie zeigte Rheinanthron mit allen untersuchten Fließmittelsystemen den gleichen Rf-Wert wie Rhein. Das Anthron wurde dann durch eine Grünfärbung mit p-Nitrosodimethylanilin auf dem Papier nachgewiesen. Außerdem gab Rheinanthron mit allen Fließmitteln einen Fleck mit dem Rf-Wert des Rheindianthrons. Auch F.C.SCHERFF (42) beschrieb schon früher diese Tatsache. Nach seinem Verhalten gegen Sprühreagentien (s.u.) handelte es sich tatsächlich um Rheindianthron, wobei schließlich nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob das Dianthron schon in der Ausgangssubstanz vorhanden war oder erst durch Autoxydation in der Lösung gebildet wurde. Aufsteigende Chromatographie unter Stickstoff nach B.FAUSTMANN (18) konnte jedenfalls das Auftreten des Dianthron-

flecks nicht unterbinden.

Der papierchromatographische Nachweis der Oxydationsprodukte des Rheinanthrons erfolgte mit der auf Seite 24 beschriebenen Methodik. Bei Verwendung von 5o %igem Methanol als Fließmittel hatte Rhein einen Rf-Wert von o,6.Rheindianthron zeigte sich bei Rf o,7. Wie schon ausgeführt, lieferte Rheinanthron beide Flecke. Im UV-Licht fluoreszierten Rhein und Rheinanthron gelb, Rheindianthron braun.
Beim Besprühen mit methanolischer Kalilauge färbte sich der Rheinfleck rot, der Rheinanthronfleck wurde gelb und nach kurzer Zeit rotviolett. Rheindianthron zeigte eine zunächst stabile Gelbfärbung, die nach einigen Stunden in eine dunkle Violett- und schließlich in eine deutliche Braunfärbung überging. Mit p-Nitrosodimethylanilin gab nur Rheinanthron eine Grünfärbung, während die am Startpunkt verbliebenen Polymeren vom gleichen Reagenz braun gefärbt wurden.

Auch auf dem Wege der Dünnschichtchromatographie ließ sich eine Identifizierung der Oxydationsprodukte des Rheinanthrons durchführen. Rhein konnte gut von Rheindianthron getrennt werden, Rheinanthron verhielt sich ähnlich wie bei der Papierchromatographie. Als Träger wurde Kieselgel G "Merck" verwendet, als Fließmittel diente das von E.STAHL (49) angegebene Gemisch Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure 5:4:1 (s.S.25). Die Rf-Werte lagen bei o,5 (Rheindianthron) und o,6 (Rhein). Es liefen jedesmal authentische Substanzen mit. Die braunen Folgeprodukte blieben auch hier am Startpunkt zurück.

Absorptionsspektren der Gemische der Reaktionsprodukte

Ein gewisser Einblick in die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Gemisches der Oxydationsprodukte des Rheinanthrons nach nichtfermentativer und fermentativer Oxydation konnte durch spektralphotometrische Messungen gewonnen werden.
Dazu wurden die Absorptionsspektren der Gemische der Oxydationsprodukte in Butylazetat aufgenommen und mit den Spektren der Reinsubstanzen im gleichen Lösungsmittel (Abb. 4) verglichen. Die Ausschüttelung der wässerigen Reaktionslösungen mit Butylazetat ist auf Seite 24 beschrieben.
Auf Abb.5 sind die Absorptionsspektren wiedergegeben, die bei drei verschiedenen Reaktionsansätzen erhalten wurden. Die Reaktionszeit war in allen drei Fällen zwei Stunden. Die Anfangskonzentration an Rheinanthron war jeweils 1,38 mg in 100 ml Reaktionslösung vom pH 6. Der deutliche Unterschied der Kurvenbilder läßt auf eine mindestens quantitativ recht unterschiedliche Zusammensetzung der einzelnen Gemische schließen.

Nach zweistündiger Autoxydation ist noch das für Rheinanthron charakteristische Maximum bei 295 nm vorhanden. Die Autoxydation des Anthrons ist also bei pH 6 nach dieser Zeit noch nicht beendet. Andererseits zeigen die Abnahme der Extinktion bei 295 nm und die Zunahme im Bereich über 400 nm sowie eine bathochrome Verschiebung des Maximums bei 365 nm, daß eine Autoxydation stattgefunden hat. Vergleicht man die Spektren der Reinsubstanzen (Abb.4), so kann man annehmen, daß im wesentlichen Rheindianthron gebildet worden ist. Über die Bildung von Rhein mit einem Maximum bei 430 nm läßt sich kaum eine Aussage machen, da nur eine geringe Extinktionserhöhung in diesem Spektralbereich registriert wird. (Abb. 5).

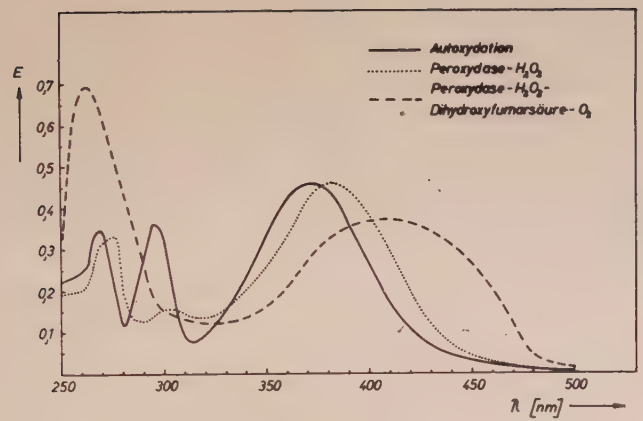


Abb. 5: Absorptionsspektren von Gemischen der Oxydationsprodukte des Rheinanthrons unter verschiedenen Reaktionsbedingungen. (s.a.S.32)

Die zweistündige Einwirkung von 25 µMol H_2O_2 und 1,o ml Peroxydaselösung bewirkt eine vollständige Oxydation des Rheinanthrons. Das Maximum bei 295 nm ist verschwunden, das zweite Maximum bei 365 nm nach 38o nm verschoben. Das erhaltene Spektrum entspricht etwa dem des Rheindianthrons. Allerdings liegen die Extinktionen im Bereich zwischen 39o und 45o nm höher als beim reinen Dianthron, so daß auch Rhein in geringer Menge im Reaktionsgemisch zu erwarten ist.
Werden neben 1,o ml Peroxydaselösung 1oo µMol Dihydroxyfumarsäure und 2oo µMol H_2O_2 zur Rheinanthronlösung gegeben, so wird nach zwei Stunden die dritte Kurve erhalten, die ganz deutlich eine starke bathochrome Verschiebung gegen die beiden anderen Spektren zeigt. Dies drückt sich auch in einer stärkeren Gelbfärbung der Lösung aus. Beides deutet auf einen größeren Anthrachinongehalt des Gemisches,

da Rhein bei 43o nm ein Absorptionsmaximum hat. Die Breite des erhaltenen Maximums in diesem Gemisch zeigt aber, daß kein reines Rhein vorliegen kann. Es muß noch ein Produkt vorhanden sein, das bei kleineren Wellenlängen stärker absorbiert. Diese Substanz ist das Rheindianthron, wie die chromatographische Analyse zeigt.

Eine Untersuchung über die quantitative Zusammensetzung der Gemische, die unter verschiedenen Reaktionsbedingungen erhalten wurden, wird in späteren Kapiteln beschrieben.

Quantitative photometrische Bestimmung von Rhein neben Rheindianthron

Qualitative chromatographische Untersuchungen hatten ergeben, daß bei der Oxydation des Rheinanthrons bei pH 6 in den meisten Fällen nur Rheindianthron und Rhein als Reaktionsprodukte auftreten. Liegen nur diese beiden Stoffe im Gemisch vor, so läßt sich eine quantitative Bestimmung beider Komponenten nebeneinander auf photometrischem Wege durchführen. Ähnliche Simultanbestimmungen von Anthron- neben Anthrachinonderivaten sind mehrfach durchgeführt worden. M.E.AUERBACH (1) und B.LIPINSKI (31) bestimmten Cignolin und Istizin, M.JACOB (27) Rheinanthron neben Rhein.
Die Methode beruht auf der Messung von Extinktionen bei zwei verschiedenen Wellenlängen. Die am besten geeigneten Wellenlängen liegen in den Absorptionsmaxima beider Substanzen, wenn jene nicht zu nahe beieinander liegen.
Im vorliegenden Falle wurden in einer Butylazetatlösung, die wie auf Seite 24 beschrieben erhalten wurde, die Extinktionen im Maximum des Rheindianthrons bei 38o nm und im Maximum des Rheins bei 43o nm gemessen und aus diesen Werten der Gehalt der Lösung an beiden Substanzen nach unten angegebener Formel berechnet.
Richtige Werte können nur erhalten werden, wenn die gemessene Lösung ausschließlich Rhein und Rheindianthron enthält. Daher wurde vor jeder Messung überprüft, ob diese Bedingung erfüllt war. Dies konnte auf chromatographischem Wege geschehen (s.S.3o). Die Abwesenheit von Rheinanthron wurde vorher durch Tüpfelreaktion mit p-Nitrosodimethylanilin überprüft. Wie die Versuche ergaben, war bei fermentativer Oxydation nach zwei Stunden, bei Autoxydation bei pH 6 nach lo Stunden kein Rheinanthron mehr nachweisbar.

Voraussetzung für die Anwendung der beschriebenen Methode ist die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes für beide Substanzen in Butylazetat sowohl bei 38o als auch bei 43o nm. Es konnte gezeigt werden, daß diese Beziehung für Konzentrationen von o,2 bzw. o,5 bis 2,o mg/1oo,o ml gilt (Abb. 6).

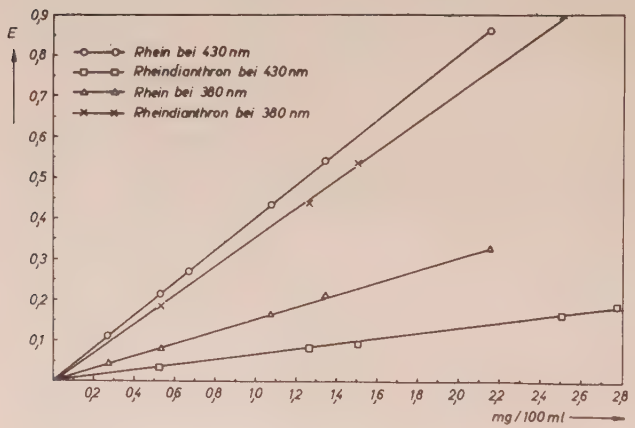


Abb. 6: Abhängigkeit der Extinktionen bei 38o und 43o nm von den Konzentrationen des Rheindianthrons und des Rheins in Butylazetat.

Die Berechnung erfolgte nach folgenden Formeln:

$$c_1 = \frac{k_2 \cdot E' - k_2' \cdot E}{k_1' \cdot k_2 - k_1 \cdot k_2'} \qquad c_2 = \frac{k_1 \cdot E' - k_1' \cdot E}{k_1 \cdot k_2' - k_1' \cdot k_2}$$

c_1 = Konz.Rheindianthron [mg%] E = Extinktion bei 38o nm
c_2 = Konz.Rhein [mg%] E'= Extinktion bei 43o nm
$k_1 = E^{1mg\%}_{1cm}$ von Rheindianthron bei 38o nm
$k_2 = E^{1mg\%}_{1cm}$ von Rhein bei 38o nm
$k'_1 = E^{1mg\%}_{1cm}$ von Rheindianthron bei 43o nm
$k'_2 = E^{1mg\%}_{1cm}$ von Rhein bei 43o nm

Die spezifischen Extinktionen wurden je fünfmal mit verschiedenen Einwaagen bestimmt und die erhaltenen Mittelwerte den Berechnungen zugrunde gelegt. Die Arbeitsweise war analog der Aufnahme der UV-Spektren. (Tab.3 u. 4).

Einwaage/loo ml Butylazetat	Extinktion bei 38o nm	$E^{1mg\%}_{1cm}$ 38o nm	Extinktion bei 43o nm	$E^{1mg\%}_{1cm}$ 43o nm
1,5 mg RD	o,535	o,357	o,o97	o,o647
2,5 mg RD	o,9o3	o,361	o,168	o,o672
2,77mg RD	1,o2o	o,368	o,19o	o,o686
2,74mg Sed.A	o,973	o,355	o,182	o,o664
1,26mg Sed.A	o,438	o,348	o,o85	o,o676
Mittelwerte:		o,358		o,o67

Tab. 3: Ermittlung der spezifischen Extinktionen von Rheindianthron bei 38o und 43o nm. RD = Rheindianthron, Sed.A = Sennidin A.

Einwaage/loo ml Butylazetat	Extinktion bei 38o nm	$E^{1mg\%}_{1cm}$ 38o nm	Extinktion bei 43o nm	$E^{1mg\%}_{1cm}$ 43o nm
1,34 mg	o,214	o,16o	o,54o	o,4o3
2,15 mg	o,332	o,154	o,86o	o,4oo
1,o75mg	o,167	o,155	o,432	o,4o2
2,65 mg	o,398	o,15o	1,o55	o,398
o,53 mg	o,o8o	o,151	o,214	o,4o4
Mittelwerte:		o,154		o,4o1

Tab. 4: Ermittlung der spezifischen Extinktionen des Rheins bei 38o und 43o nm.

Die gefundenen Werte wurden in die angegebenen Formeln eingesetzt. So errechnet sich der Gehalt einer Lösung an Rheindianthron und Rhein nach:

$$c_{RD}\,[mg\%] = \frac{2{,}6 \cdot E_{38o\ nm} - E_{43o\ nm}}{o{,}865}$$

$$c_{R}\,[mg\%] = \frac{5{,}34 \cdot E_{43o\ nm} - E_{38o\ nm}}{1{,}988}$$

Zur Überprüfung der Methode wurden Mischungen von Rhein und Rheindianthron hergestellt und die Bestandteile quantitativ bestimmt (Tab. 5).Es ergab sich, daß bei geringen Einwaagen mit größeren Fehlern gerechnet werden muß. Bei etwa gleich großer Einwaage beider Substanzen war die Genauigkeit erheblich besser.

Einwaagen		gefunden
0,625 mg RD 0,538 mg R	E_{380} = 0,306 E_{430} = 0,257	0,623 mg RD = 99,7 % 0,536 mg R = 99,6 %
0,250 mg RD 1,075 mg R	E_{380} = 0,252 E_{430} = 0,446	0,241 mg RD = 96,4 % 1,07 mg R = 99,5 %
1,25 mg RD 0,215 mg R	E_{380} = 0,478 E_{430} = 0,174	1,235 mg RD = 98,8 % 0,227 mg R =105,6 %

Tab. 5: Überprüfung der Simultanbestimmungsmethode für Rheindianthron und Rhein. RD = Rheindianthron, R = Rhein.

Autoxydation des Rheinanthrons in verschiedenen pH - Bereichen

Aus der Literatur (44,52) war bekannt, daß die Autoxydation von Anthronen nicht immer quantitativ zu Anthrachinonen führt. Neben diesen treten auch Dianthronderivate auf und zwar im stärkeren Maße im sauren bis schwach alkalischen pH-Bereich, während im stärker alkalischen Gebiet eine größere Neigung zur Anthrachinonbildung zu bemerken ist. Auf dieser Erkenntnis basieren alle die quantitativen Anthronbestimmungen, die auf der Ermittlung des aus dem Anthron in s t a r k e r Lauge durch Autoxydation gebildeten Anthrachinons beruhen (2,27).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die im Bereich pH 6 bis 10 entstehenden Autoxydationsprodukte des Rheinanthrons untersucht, um einige Aussagen über den Einfluß des pH-Wertes auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Oxydationsprodukte zu erhalten. Die Ergebnisse wurden mit denen der fermentativen Oxydation des Rheinanthrons verglichen.
Zunächst wurde der Zeitraum annähernd ermittelt, der bei verschiedenen pH-Werten zur vollständigen Autoxydation einer definierten Rheinanthronmenge notwendig ist. Dazu wurde je etwa 1 mg Rheinanthron in 1 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 99 ml 0,05 m Pufferlösungen vom pH 6 , 7 , 8 , 9 oder 10 versetzt. Nach 2 , 4 , 8 , 12 und 24 Stunden wurde mit Salzsäure stark angesäuert und jeder Ansatz mit 10 ml Butylazetat ausgeschüttelt. Diese Lösung wurde für die folgenden Untersuchungen verwendet. 1 ml dieser Lösung wurde auf Filtrierpapier aufgetragen, getrocknet und mit p-Nitrosodimethylanilin, mit dem noch 0,2 µg Cignolin nachgewiesen werden können (28,55), auf Anwesenheit von Rheinanthron geprüft. Bei Vorhandensein eines Anthronderivates tritt eine deutliche Grünfärbung des vorher gelben Fleckes auf.

Bei pH 8 bis 10 war Rheinanthron bereits nach zwei Stunden nicht mehr nachweisbar, nach vier Stunden war es aus der Lösung vom pH 7 verschwunden, während bei pH 6 noch nach acht Stunden Anthron nachgewiesen wurde. Erst nach zwölf Stunden war auch hier kein Rheinanthron mehr festzustellen.

Die nach 24 Stunden erhaltenen Butylazetatextrakte wurden papierchromatographisch untersucht. Dazu wurde je 1 ml Lösung aufgetragen und absteigend mit 50 %igem Methanol entwickelt. Auf allen Chromatogrammen ließen sich Rhein und Rheindianthron nachweisen. Bei pH 9 und 10 waren außerdem Produkte entstanden, die als braune Flecke am Startpunkt zurückblieben. In keiner Lösung wurde nur ein definiertes Oxydationsprodukt gefunden. Es lag in allen Fällen ein Gemisch von zwei oder mehr Verbindungen vor.

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine quantitative Bestimmung der Oxydationsprodukte des Rheinanthrons nach der beschriebenen Methode nur aus den Pufferlösungen vom pH 6 bis 8 möglich ist, da die Autoxydation bei pH 9 und 10 eine unbekannte Zahl verschiedener Produkte ergibt, deren einzelne Erfassung bisher nicht möglich ist. Dementsprechend wurden nur die Lösungen mit pH - Werten von 6 bis 8 quantitativ untersucht.

Die Messungen ergaben, daß bei einer Reaktionszeit von 24 Stunden der Rheingehalt der Lösungen mit steigendem pH zunimmt. (Tab.6). Es zeigte sich auch, daß sich die einmal gebildeten Konzentrationen an Rhein und Rheindianthron nach vollständiger Umsetzung des Rheinanthrons innerhalb des beobachteten Zeitraums nur noch geringfügig ändern. Danach ist eine Autoxydation des Rheindianthrons bei pH 6 - 8 zu Rhein in größerem Maße nicht zu erwarten. Die Autoxydation des Rheindianthrons nimmt aber mit steigendem pH zu (Tab.6). Bei Zusatz von Wasserstoffperoxyd zu den Reaktionslösungen (25 μ Mol H_2O_2 zu 100 ml Pufferlösung mit 5 μ Mol Rheinanthron) wurden nach 24 Stunden

im gleichen pH-Bereich ungefähr die gleichen Endkonzentrationen an Rhein und Rheindianthron wie ohne Wasserstoffperoxyd (Tab. 6) erhalten.

Rheinanthron [mg/100 ml]	pH	Zeit [h]	Extinktion 380 [nm]	430	RD [mg]	R [mg]	%R
1,33	6	2		0,072	(RA noch positiv)		
1,35	6	4		0,112			
1,25	6	24	0,398	0,146	1,03	0,190	14,4
1,25 + 25 µMol H_2O_2	6	24	0,404	0,138	1,055	0,167	12,7
1,36	7	2		0,170	(RA noch positiv)		
1,36	7	4	0,410	0,198	1,00	0,325	22,7
1,37	7	24	0,412	0,216	0,99	0,374	25,9
1,37 + 25 µMol H_2O_2	7	24	0,406	0,218	0,97	0,381	26,4
1,36	8	2	0,412	0,196	1,01	0,320	22,4
1,36	8	4	0,405	0,218	0,965	0,382	26,7
1,37	8	24	0,400	0,237	0,93	0,435	30,2
1,37 + 25 µMol H_2O_2	8	24	0,406	0,238	0,95	0,435	30,2

Tab. 6: Autoxydation von Rheinanthron bei pH 6 bis 8. Solange noch Rheinanthron als dritte Komponente neben Rheindianthron (RD) und Rhein (R) in der Lösung vorhanden war, wurde zur Darstellung der Zunahme des Rheingehaltes nur die Extinktion bei 430 nm angegeben.

Autoxydation des Rheinanthrons bei pH 6

Da die Versuche zur fermentativen Oxydation des Rheinanthrons bei pH 6 ausgeführt wurden, war eine eingehende Untersuchung der Autoxydation bei diesem pH-Wert notwendig.

Wie im vorigen Abschnitt gezeigt, konnten bei pH 6 innerhalb des Zeitraums von 24 Stunden Rhein und Rheindianthron als Produkte einer Autoxydation des Rheinanthrons nachgewiesen werden. Das Hauptprodukt der Reaktion ist das Rheindianthron. Rhein wird nur in geringem Umfang gebildet (Tab. 6 und 7). In dem wässerigen Puffersystem ist eine quantitative Autoxydation des Rheinanthrons bei pH 6 erst nach etwa zehn Stunden erreicht, was durch Messung der Extinktionsabnahme im für Rheinanthron charakteristischen Absorptionsmaximum bei 295 nm bis zu einer konstanten Extinktion gezeigt werden konnte (Abb. 7). Nach kürzeren Reaktionszeiten war das Anthron durch Tüpfelreaktion mit p-Nitrosodimethylanilin noch nachweisbar. So konnten keine Aussagen über die quantitative Zusammensetzung der Reaktionsgemische gemacht werden, solange noch Rheinanthron nachgewiesen wurde, da die Bestimmungsmethode nur die Erfassung des Zweistoffgemisches Rhein-Rheindianthron zuließ. Der mit der Reaktionsdauer zunehmende Anthrachinongehalt der Lösungen wurde daher bis zur vollständigen Oxydation des Rheinanthrons lediglich durch steigende Extinktionen bei 43o nm (Absorptionsmaximum des Rheins) ausgedrückt. Die quantitative Bestimmung beider Oxydationsprodukte wurde nach 24stündiger Reaktionszeit durchgeführt. (Tab.7).
Es zeigte sich, daß in wässeriger Lösung bei pH 6 bis zu 15 % des der Autoxydation ausgesetzten Rheinanthrons als Rhein wiedergefunden werden konnten. Der Rest war zum Rheindianthron dimerisiert.
Wurde den Lösungen Wasserstoffperoxyd zugesetzt, so resultierten die gleichen Oxydationsprodukte. Der Anthrachinonanteil war geringfügig zugunsten der Dianthronausbeute

verringert. Dabei bestand jedoch keine Abhängigkeit von der im Überschuß zugesetzten Wasserstoffperoxydmenge. Gegenüber der Autoxydation durch Luftsauerstoff blieb die Reaktionsgeschwindigkeit praktisch unverändert.
Im Zusammenhang mit später durchgeführten Versuchen zur fermentativen Hydroxylierung des Rheinanthrons war der Einfluß von Mn-II-Ionen auf den Autoxydationsvorgang von Interesse. Es zeigte sich, daß Mn-II-chlorid die Anthrachinonbildung hemmte und damit die Dianthronausbeute erhöhte.

RA [mg]	Zusätze [µMol]	Zeit [h]	Extinktion 38o [nm]	43o	RD [mg]	R	%R
1,23		4		o,11o			
1,33		8		o,133			
1,26		24	o,412	o,146	1,o7	o,185	13,9
1,25		24	o,398	o,146	1,o3	o,19o	14,4
1,35	25 H_2O_2	4		o,1o8			
1,33	25 H_2O_2	8		o,138			
1,53	1o H_2O_2	24	o,51o	o,173	1,33	o,2o8	12,9
1,35	25 H_2O_2	24	o,438	o,152	1,14	o,188	13,2
1,53	5o H_2O_2	24	o,5o1	o,168	1,31	o,198	12,3
1,53	1oo H_2O_2	24	o,5o5	o,172	1,32	o,2o8	12,9
1,53	2oo H_2O_2	24	o,5o9	o,171	1,33	o,2o3	12,6
1,41	1 $MnCl_2$	24	o,487	o,123	1,322	o,o85	5,7
1,41	1o $MnCl_2$	24	o,488	o,125	1,324	o,o9o	6,1
1,41	1oo $MnCl_2$	24	o,49o	o,12o	1,335	o,o76	5,1
1,41	1o $MnCl_2$ + 25 H_2O_2	24	o,487	o,119	1,325	o,o75	5,1

Tab. 7: Autoxydation des Rheinanthrons (RA) bei pH 6. Solange noch Rheinanthron als dritte Komponente neben Rheindianthron (RD) und Rhein (R) in der Lösung vorhanden war, wurde zur Darstellung der Zunahme des Anthrachinongehaltes nur die Extinktion bei 43o nm angegeben.

Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd

In einigen Versuchen wurde zunächst festgestellt, ob ein Angriff des oxydierenden Systems Meerrettichperoxydase-Wasserstoffperoxyd auf das Rheinanthron stattfindet. Hierzu wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Fermentreaktion im Vergleich zur Autoxydation gemessen.
Bei UV-Absorptionsmessungen von Rheinanthronlösungen war bei zunehmender Oxydation eine Abnahme der Extinktion bei 295 nm im Absprotionsmaximum des Rheinanthrons beobachtet worden. Die Abnahme der Lichtabsorption bei dieser Wellenlänge konnte daher als Maß für die abnehmende Rheinanthronkonzentration gelten. Trat keine Änderung der Extinktion in diesem Bereich mehr ein, so konnte daraus auf die vollständige Oxydation des Anthrons geschlossen werden, was durch Tüpfelreaktion mit p-Nitrosodimethylanilin bestätigt werden konnte. Zum Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten genügte es, die Abnahme der Rheinanthronkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit zu betrachten, ohne eine quantitative Umsetzung des Rheinanthrons woraussetzen zu müssen.
Auf Abbildung 7 ist die Extinktionsabnahme bei 295 nm in Abhängigkeit von der Zeit bei der Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd im Vergleich zur Autoxydation und zur Reaktion mit Wasserstoffperoxyd ohne Fermentzusatz dargestellt. Wie in allen späteren Untersuchungen wurden die Versuche bei pH 6 ausgeführt.
Beim Vergleich der Reaktionskurven wird deutlich, daß die Fermentreaktion weitaus rascher abläuft und bereits in weniger als zwei Stunden zum Stillstand kommt. Die Autoxydation dagegen zieht sich über einen Zeitraum von zehn Stunden hin und verläuft dementsprechend langsam. Ein Zusatz von Wasserstoffperoxyd bei Abwesenheit von Peroxydase verändert die Reaktionsgeschwindigkeit nicht.

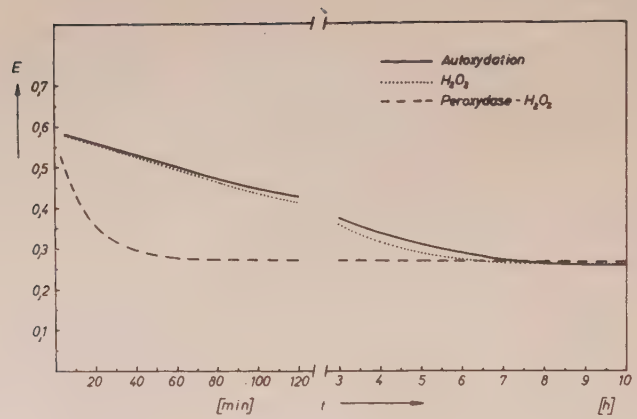


Abb. 7: Extinktionsabnahme bei 295 nm in Abhängigkeit von der Zeit bei der Oxydation des Rheinanthrons (1,39 mg) durch Peroxydase (o,1 ml) und Wasserstoffperoxyd (1o µMol) in 1oo ml o,o1 m pH 6 Puffer, bei der Autoxydation und bei Zusatz von 1o µMol H_2O_2.

Höhere Peroxydasekonzentrationen (o,5 und 1,o ml Peroxydaselösung auf 1oo ml Reaktionsansatz) veränderten die Reaktionszeit nicht. Die erhaltenen Kurven stimmten in bestimmten Grenzen mit der abgebildeten überein. Durch Veränderung der Wasserstoffperoxydkonzentration (2,5 ; 25 und 5o µMol) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit ebenfalls nicht verändert.

Papierchromatographische Untersuchungen der Reaktionslösungen zeigten, daß wie bei der Autoxydation des Rheinanthrons auch bei der fermentativen Oxydation durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd Rhein und Rheindianthron als Reaktionsprodukte zu finden waren.
Einen Hinweis auf das Mengenverhältnis der beiden Oxydationsprodukte bot ein Vergleich der Absorptionsspektren der Reaktionsgemische nach zehnstündiger Reaktionszeit

bei fermentativer und nichtfermentativer Oxydation. Dabei zeigte das bei der Peroxydasereaktion erhaltene Gemisch geringere Extinktionen im Wellenlängenbereich über 4oo nm und eine größere Absorption im Bereich 3oo bis 39o nm. Außerdem ergab sich ein Unterschied im kurzwelligen Maximum zwischen 26o und 28o nm (Abb. 8). Nach Betrachtung der UV-Spektren der Reinsubstanzen Rhein und Rheindianthron (Abb.4) wäre aus der Fermentreaktion ein geringerer Anthrachinonanteil als aus der Autoxydation zu erwarten. Dafür ist nach Peroxydaseeinwirkung eine größere Dianthronmenge zu erwarten. Quantitative Bestimmungen beider Oxydationsprodukte konnten diese Annahmen bestätigen (Tab. 7 und 8).

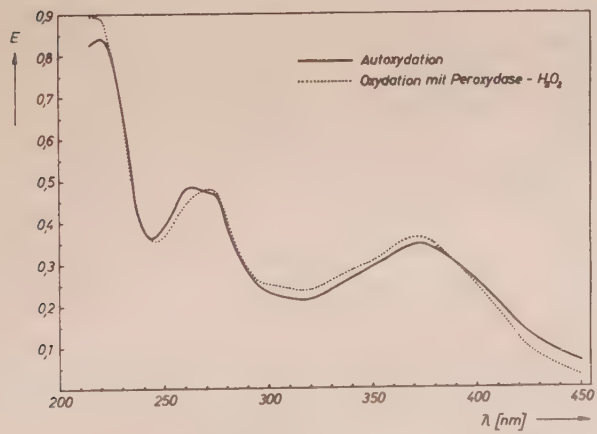


Abb. 8: Absorptionsspektren von Reaktionslösungen nach beendeter Oxydation gleicher Rheinanthronkonzentrationen durch Peroxydase-H_2O_2 (o,1 ml; loμMol) bzw. durch Autoxydation in loo ml o,ol m pH 6 Puffer nach zehn Stunden. (Einwaage 1,39 mg Rheinanthron).

Wurde das Spektrum der Peroxydasereaktion schon nach dreistündiger Reaktion aufgenommen, so ergab die Messung etwa das gleiche Bild wie nach zehn Stunden, so daß angenommen werden konnte, daß nach Beendigung der Rheinanthronoxydation innerhalb von zehn Stunden keine weiteren Veränderungen in der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches auftreten.

Die bei den quantitativen Bestimmungen der Oxydationsprodukte, die durch peroxydasekatalysierte Oxydation des Rheinanthrons erhalten wurden, gefundenen Werte sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Aus ihr lassen sich folgende Ergebnisse entnehmen:

1. In wässeriger Lösung bei pH 6 ist die Oxydation des Rheinanthrons in der verwendeten Konzentration von 5 μMol/loo ml durch Peroxydase (o,1 ml) und Wasserstoffperoxyd innerhalb von zwei Stunden beendet. Als Oxydationsprodukte treten Rheindianthron und Rhein auf. Hauptprodukt der Reaktion ist das Rheindianthron. Nach Beendigung der Reaktion verändert sich die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches in einem Zeitraum von 24 Stunden nicht weiter, wenn nur geringe Fermentkonzentrationen (o,1 ml/loo ml) gewählt werden. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Versuchen.

2. Eine Änderung der Wasserstoffperoxydkonzentration (5- 25 μMol/loo ml) ruft keine meßbare qualitative oder quantitative Veränderung der Ergebnisse hervor.

3. Bei erhöhter Peroxydasekonzentration (o,5 und 1,o ml /loo ml) wird die Extinktion bei 43o nm unabhängig von der im Überschuß verwendeten H_2O_2-Menge (5-25 μMol) stärker erhöht. Dies kann durch eine höhere Antrachinonkonzentration hervorgerufen werden, ist aber mit größerer Wahrscheinlichkeit auf die Absorption anderer Reaktionsprodukte zurückzuführen (s.a.unter 4. und Diskussion).

RA [mg]	P [ml]	H_2O_2 [µMol]	Zeit [h]	Extinktion 38o [nm]	43o	RD [mg]	R [mg]	%R
1,24	o,1	5	2	o,435	o,o85	1,21	o,o1	o,77
1,28	o,1	1o	2	o,452	o,o89	1,255	o,o15	1,1
1,45	o,1	25	2	o,5o5	o,1o3	1,4	o,o23	1,5
1,3o	o,1	25	2	o,46o	o,o88	1,28	o,oo5	o,4
1,23	o,1	25	4	o,428	o,o75	1,2	o	o
1,29	o,1	25	8	o,455	o,o9o	1,26	o,o13	1,o
1,23	o,1	25	24	o,432	o,o86	1,2	o,o14	1,1
1,35	o,5	5	2	o,473	o,1o8	1,3	o,o52	3,7
1,23	o,5	1o	2	o,424	o,o93	1,16	o,o36	2,9
1,3o	o,5	25	2	o,45o	o,1oo	1,24	o,o42	3,1
1,35	o,5	25	4	o,476	o,1o6	1,31	o,o45	3,2
1,29	o,5	25	8	o,436	o,o95	1,2	o,o36	2,7
1,23	o,5	25	24		o,o92	braune Folgeprod.		
1,24	1,o	5	2	o,415	o,1o4	1,13	o,o7	5,4
1,32	1,o	1o	2	o,445	o,114	1,2	o,o82	5,9
1,45	1,o	25	2	o,495	o,132	1,335	o,1o6	6,9
1,3o	1,o	25	2	o,446	o,1o6	1,22	o,o6	4,4
1,28	1,o	25	4	o,432	o,114	1,17	o,o89	6,6
1,33	1,o	25	8	o,445	o,1oo	braune Folgeprod.		
1,31	1,o	25	24	o,383	o,1oo	braune Folgeprod.		
1,31	1,o	5	24	o,325	o,o98	braune Folgeprod.		

Tab. 8: Oxydation des Rheinanthrons (RA) durch Peroxydase (P) und Wasserstoffperoxyd zu Rheindianthron (RD) und Rhein (R). Die Identifizierung der Oxydationsprodukte erfolgte dünnschichtchromatographisch (s.S.25).

4. Werden große Peroxydasekonzentrationen verwendet, so treten Reaktionsprodukte auf, die sich durch langsam zunehmende Braunfärbung der Lösung bemerkbar machen. Nach achtstündiger Reaktionszeit können sie auch papier- und

dünnschichtchromatographisch als braune, am Startpunkt zurückbleibende Flecken nachgewiesen werden. Die braunen Folgeprodukte sind teilweise mit Butylazetat ausschüttelbar, der Rest bleibt zwischen den Phasen hängen. Damit wird eine quantitative Bestimmung der Oxydationsprodukte unmöglich, da nun ein Gemisch von mehr als zwei Substanzen vorliegt. Die erwähnten braunen Reaktionsprodukte, die nicht näher identifiziert wurden, absorbieren im Wellenlängenbereich zwischen 38o und 43o nm, was eine informierende Messung zeigte. So wurde immer dann, wenn diese Substanzen nachgewiesen werden konnten, auf eine Berechnung der Rheindianthron- und Rheinausbeuten verzichtet. Auf die hier dargestellten Beobachtungen gründet sich die Annahme, daß eine mit der Peroxydasemenge gesteigerte Anthrachinonkonzentration eventuell vorgetäuscht sein kann. Die erwähnten Folgeprodukte können in unter der chromatographischen Nachweisgrenze liegenden Konzentrationen wohl eine falsch zu deutende Absorptionsveränderung bei 38o bzw. 43o nm erzeugen (s.a.unter 3.).

Oxydation von Rheinanthron mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd in Gegenwart phenolischer Überträger

Die Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd führt nur in geringem Maße zum Antrachinon. Daher wurde untersucht, ob o-Diphenole in der Lage sind, eine Überträgerwirkung auszuüben und die Oxydation des Rheinanthrons zum Rhein zu begünstigen. o-Diphenole werden von Peroxydase-H_2O_2 zu o-Chinonen oxydiert, die sehr reaktionsfähig sind.
Für die eigenen Versuche wurden das Brenzkatechin und seine im Pflanzenreich verbreiteten Derivate, die Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) und die Protokatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure) ausgewählt.
Bei Zusatz von o,o5 µMol Brenzkatechin bzw. Kaffeesäure oder Protokatechusäure zu loo ml Reaktionsansatz vom pH 6, der 5 µMol Rheinanthron neben Peroxydase und Wasserstoffperoxyd enthielt, wurden nach zweistündiger Reaktionszeit wiederum Rheindianthron und Rhein chromatographisch nachgewiesen (Tab. 9). Die ermittelten Konzentrationen wichen nicht von einem Ansatz ohne Überträgersubstanz ab.
Wurde die o-Diphenolkonzentration um eine Zehnerpotenz erhöht, so war bereits nach zwei Stunden eine deutliche Braunfärbung der Reaktionslösung zu bemerken. Bei Abwesenheit der o-Diphenole war eine Bräunung erst nach acht Stunden registriert worden (Tab.8).
Blindversuche ohne Rheinanthron ergaben, daß alle drei Diphenole in den angewandten Konzentrationen mit Peroxydase und H_2O_2 weder braune Lösungen gaben, noch im interessierenden Spektralbereich zwischen 38o und 43o nm merklich erhöhte Extinktionen zeigten (in allen Fällen $E < o,o2$). Da mit solchen Störungen bei höheren Phenolkonzentrationen zu rechnen war, was aus informierenden Messungen hervorging, wurden nicht mehr als jeweils

o,5 µMol/loo ml o-Diphenol verwendet.
Die Versuche mit phenolischen Überträgern zeigen, daß bei der Oxydation des Rheinanthrons die Reaktionen begünstigt sind, die zur Bildung brauner, nicht näher beschriebener Dehydrierungsprodukte führen. Diese sind neben Rheindianthron und Rhein chromatographisch nachweisbar. Eine Steigerung der Anthrachinonausbeute war weder aus den Chromatogrammen noch aus den gemessenen Extinktionen abzuleiten. Für die chromatographische Methode waren die Unterschiede zu gering. Photometrisch wurde zwar eine höhere Extinktion bei 43o nm bestimmt, doch ist diese möglicherweise auf teilweise ausgeschüttelte weiter oxydierte Verbindungen, die die Braunfärbung verursachen, zurückzuführen. So wird eine größere Rheinmenge nur vorgetäuscht (Tab.9).

RA [mg]	o-Diphenol [µMol]	Extinktion 38o [nm]	43o	RD [mg]	R	%R
1,225	o	o,412	o,1o6	1,12	o,o77	6,o
1,225	o,o5 B	o,4o6	o,1o5	1,1	o,o78	6,1
1,225	o,o5 K	o,413	o,1o4	1,12	o,o71	5,5
1,225	o,o5 Pr	o,418	o,1o4	1,14	o,o69	5,3
1,32	o	o,445	o,114	1,2	o,o82	5,9
1,32	o,5 B	o,385	o,132	braune Folgeprodukte		
1,32	o,5 K	o,385	o,124	braune Folgeprodukte		
1,32	o,5 Pr	o,433	o,128	braune Folgeprodukte		

Tab.9: Oxydation des Rheinanthrons (RA) durch Peroxydase-H_2O_2 in Gegenwart von Brenzkatechin (B), Kaffeesäure (K) oder Protokatechusäure (Pr) bei pH 6, Reaktionszeit zwei Stunden. 1,o ml Peroxydaselsg, 25 µMol H_2O_2/loo ml.

Reaktion des Rheinanthrons mit dem System Peroxydase - Wasserstoffperoxyd - Dihydroxyfumarsäure - Sauerstoff

Mehrfach ist in den letzten Jahren von H.S.MASON und Mitarbeitern (lo,33,34) über Hydroxylierungen aromatischer Verbindungen bei Anwesenheit von Peroxydase, Dihydroxyfumarsäure und Sauerstoff berichtet worden. Seit 1939 ist bekannt, daß Meerrettichperoxydase gegenüber der Dihydroxyfumarsäure als Oxydase wirkt (54). Die Dihydroxyfumarsäure kann innerhalb des Pflanzenstoffwechsels auftreten und ist in einigen Fällen auch nachgewiesen worden (32). Angeregt durch die Arbeiten von H.S.MASON wurde nun untersucht, ob bei einer Reaktion des Rheinanthrons mit Peroxydase, Dihydroxyfumarsäure und Sauerstoff ein größerer Anteil des Rheinanthrons zum Anthrachinon oxydiert wird als bei der Autoxydation oder der Oxydation durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd. Wenn eine Hydroxylierung des Anthrons zum entsprechenden Anthrahydrochinon erfolgte, so konnte eine größere Anthrachinonausbeute erwartet werden, da das Anthrahydrochinon sehr oxydationsempfindlich ist (35).

Bei der Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure und Sauerstoff wurden in Reaktionszeiten bis zu 24 Stunden nur die Oxydationsprodukte Rhein und Rheindianthron nachgewiesen. Auf chromatographischem Wege wurden keine anderen Hydroxylierungsprodukte des Rheinanthrons gefunden. Der chromatographische Nachweis beider Substanzen wurde durch Elution der Substanzflecke aus Papierchromatogrammen und Aufnahme der UV-Spektren erhärtet. Der Vergleich mit den von authentischem Rhein und Rheindianthron erhaltenen Spektren zeigt, daß beide Verbindungen auch als Produkte der Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydasereaktion in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure auftreten und keine neuen Hydroxylierungsprodukte resultieren. (Abb. 9 und lo).

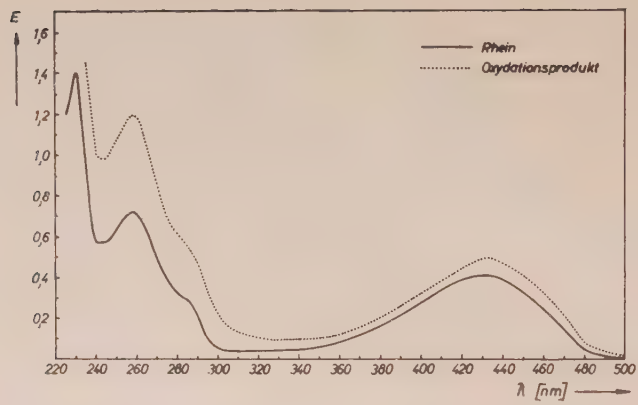


Abb. 9: Absorptionsspektren von eluiertem Oxydationsprodukt in Methanol und von 1,oo mg Rhein in loo,o ml Methanol.

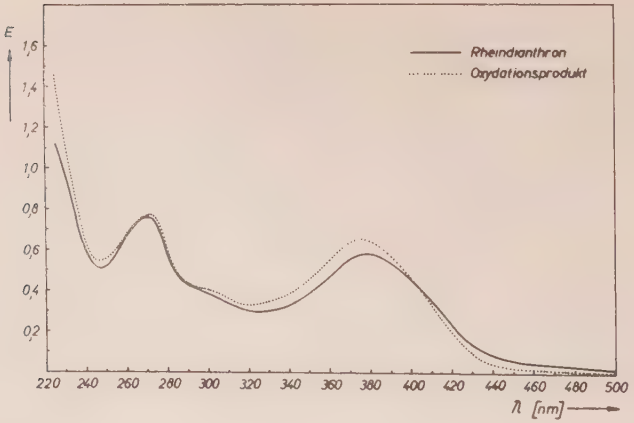


Abb. lo: Absorptionsspektren von eluiertem Oxydationsprodukt in Methanol und von 1,79 mg halbsynthetischem Rheindianthron in loo,o ml Methanol.

Die Absorptionsspektren der Abbildungen 9 und 1o wurden auf folgende Weise erhalten: Etwa 1,35 mg Rheinanthron wurden bei pH 6 mit Peroxydase (1,o ml), Wasserstoffperoxyd (1oo µMol) und Dihydroxyfumarsäure (5o µMol) in einem Ansatz von 1oo ml versetzt. Dieser Reaktionsansatz lieferte innerhalb von zwei Stunden etwa gleiche Teile Rhein und Rheindianthron (s.Tab.12). Das Reaktionsgemisch wurde mit Butylazetat ausgeschüttelt und die Lösung als Streifen auf Whatman I-Papier (vorher durch 12stündige Extraktion mit Methanol im Soxhlet gewaschen und dann getrocknet) aufgetragen. Darauf wurde mit 5o %igem Methanol absteigend über eine Strecke von 35 cm chromatographiert, nach dem Trocknen wurden die Streifen ausgeschnitten. Beide Substanzstreifen wurden mit Methanol eluiert. Von den erhaltenen, konzentrierten Methanollösungen wurden die Spektren im Spektralphotometer aufgenommen.

Es stellte sich weiter heraus, daß bei der fermentativen Oxydation des Rheinanthrons in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure größere Anthrachinonausbeuten erzielt werden als bei Abwesenheit des Endiols. (Eine Störung der photometrischen Auswertung tritt durch den Zusatz von Dihydroxyfumarsäure nicht auf, da sie und ihre Oxydationsprodukte keine Absorption im Bereich zwischen 38o und 43o nm zeigen (Abb.3)).
Um eine registrierbare Wirkung des Systems Peroxydase-Dihydroxyfumarsäure auf die Anthrachinonbildung zu erhalten, ist sowohl die Anwesenheit von Sauerstoff als auch von Wasserstoffperoxyd notwendig. Im Stickstoffstrom konnte noch nach 24 Stunden Rheinanthron im Reaktionsgemisch nachgewiesen werden. Ein Teil des Rheinanthrons war durch Autoxydation, hervorgerufen durch nicht restlos entfernten Luftsauerstoff, in Rheindianthron übergegangen (Tab.1o). Peroxydase und Dihydroxyfumarsäure übten

keine erkennbare Wirkung aus. Wurde der gleiche Reaktionsansatz einem Sauerstoffstrom ausgesetzt, so war zwar das Rheinanthron nach 24 Stunden quantitativ oxydiert worden, doch war die Rheinausbeute nicht größer als bei der Autoxydation (Tab.7 und 1o). Ein Eingriff von Peroxydase-Dihydroxyfumarsäure in den Verlauf der Reaktion war auch hier nicht zu erkennen. War dagegen neben Sauerstoff auch Wasserstoffperoxyd in der Lösung vorhanden, so konnte eine erhöhte Rheinkonzentration gemessen werden. Im Stickstoffstrom wurde Rheinanthron durch Peroxydase, Wasserstoffperoxyd und Dihydroxyfumarsäure praktisch nur zu Rheindianthron oxydiert. Zur Anthrachinonbildung ist also in dieser Reaktion auch Sauerstoff erforderlich. Da Katalase die Bildung größerer Rheinmengen hemmt, ergibt sich, daß auch Wasserstoffperoxyd für die Rheinbildung durch dieses System notwendig ist. (Tab. 1o).

RA [mg]	Gas	H_2O_2 [µMol]	Zeit [h]	Extinktion 38o [nm]	43o	RD [mg]	R [mg]	%R
1,39	N_2	o	24	o,458	o,o56	noch Rheinanthron		
1,39	O_2	o	24	o,433	o,157	1,12	o,2o4	13,9
1,4o	O_2	1	4	o,435	o,176	1,1	o,254	17,2
1,39	O_2	1o	4	o,397	o,251	o,9o3	o,474	32,4
1,39	N_2	1o	4	o,49o	o,1o2	1,355	o,o28	1,9
1,26	O_2	Katalase	24	o,439	o,125	1,118	o,115	8,7

Tab.1o: Oxydation des Rheinanthrons (RA) zu Rheindianthron (RD) und Rhein (R) in Gegenwart von je 1 ml Peroxydaselösung und 5o µMol Dihydroxyfumarsäure/1oo ml in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Sauerstoff und Wasserstoffperoxyd.

Bei allen folgenden Versuchen wurde auf strömenden Sauerstoff verzichtet. Da Luft Zutritt zu den Reaktionslösungen hatte, war für eine genügende Sauerstoffkonzentration gesorgt.

Es wurde nun systematisch untersucht, welche Faktoren bei der Oxydation des Rheinanthrons zum Rhein durch das System Peroxydase-Wasserstoffperoxyd-Dihydroxyfumarsäure-Sauerstoff eine Rolle spielen.
Zunächst wurde geprüft, ob ein Zusatz von Peroxydase für die Bildung des Rheins notwendig ist oder ob Rheinanthron in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure und Wasserstoffperoxyd schon in erhöhtem Maße in sein Anthrachinonderivat übergeht. Dabei ergab sich, daß ein Einfluß der Peroxydase vorlag, da ohne Ferment nur die der Autoxydation entsprechenden Rheinausbeuten registriert wurden (Tab.7 und 11). 1,o ml Peroxydaselösung/loo ml übte einen größeren Effekt auf die Anthrachinonbildung aus als o,1 ml/loo ml Reaktionsgemisch.

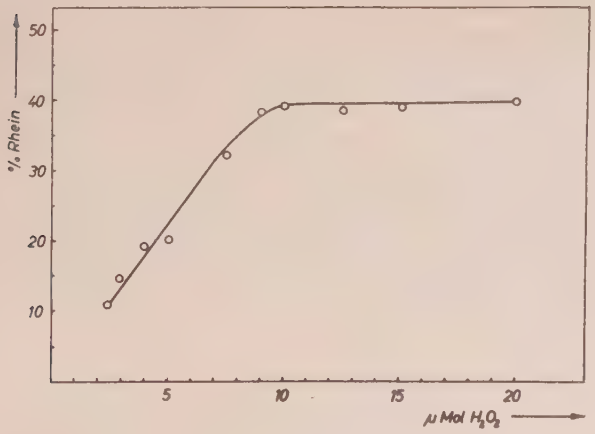


Abb.11: Abhängigkeit der Rheinausbeute von der Wasserstoffperoxydmenge neben 1,o ml Peroxydaselsg. und 5o µMol Dihydroxyfumarsäure/loo ml bei der Oxydation von 5 µMol Rheinanthron.

Der Einfluß der Wasserstoffperoxydkonzentration auf die Anthrachinonausbeute geht aus Abb.11 hervor. Bei einer konstanten Dihydroxyfumarsäurekonzentration von 5o µMol/ loo ml steigt die Rheinausbeute bei der Oxydation von 5 µMol Rheinanthron bis zu einer H_2O_2-Menge von etwa lo µMol/ loo ml an. Größere Wasserstoffperoxydkonzentrationen bis zu 2oo µMol beeinflussen die gebildete Anthrachinonmenge dann nur noch wenig (s.Tab.11 und 12).

RA [mg]	P [ml]	H_2O_2 [µMol]	DHF [µMol]	Zeit [h]	Extinktion 38o [nm]	43o	RD [mg]	R	%R
1,36	o	lo	5	24	o,439	o,164	1,13	o,22	15,4
1,36	o	loo	5o	24	o,443	o,166	1,14	o,223	15,6
1,36	o	2oo	loo	24	o,438	o,163	1,13	o,217	15,2
1,36	o	2oo	o	24	o,441	o,159	1,14	o,2o5	14,3
1,29	o,1	25	5	2	o,415	o,123	1,11	o,12	8,8
1,38	1,o	25	5	2	o,437	o,16o	1,13	o,21	14,5
1,38	o,1	25	25	2	o,415	o,184	1,o4	o,286	19,7
1,38	1,o	25	25	2	o,388	o,23o	o,9	o,42	28,9
1,21	1,o	12,5	25	2	o,334	o,192	o,78	o,346	27,2
1,21	1,o	25	25	2	o,336	o,2o3	o,77	o,38	29,8
1,21	1,o	5o	25	2	o,325	o,2o2	o,74	o,38	29,8
1,21	1,o	loo	25	2	o,349	o,21o	o,81	o,39	3o,6

Tab. 11: Oxydation des Rheinanthrons (RA) in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure (DHF) durch variierende Mengen von Peroxydase (P) und Wasserstoffperoxyd zu Rheindianthron (RD) und Rhein (R).

Eine wichtige Rolle bei der Höhe der Anthrachinonausbeuten spielt die Konzentration der Dihydroxyfumarsäure. Auf Abbildung 12 ist die Zunahme der Rheinkonzentration in Abhängigkeit von der Dihydroxyfumarsäuremenge bei der Oxydation von 5 µMol Rheinanthron mit 1,o ml Peroxydaselösung und lo µMol H_2O_2 in loo ml Pufferlösung pH 6 dargestellt. Daraus läßt sich entnehmen, daß bei steigenden Endiolkonzentrationen auch die Anthrachinonmenge steigt. (s.a.Tab. 12).

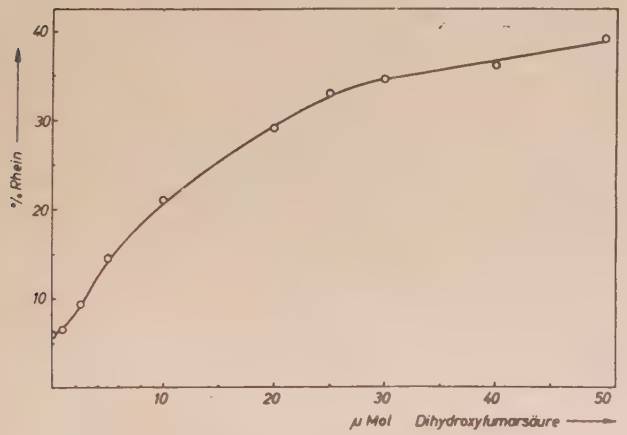


Abb.12: Abhängigkeit der Rheinausbeute von der Dihydroxyfumarsäurekonzentration bei der Oxydation des Rheinanthrons (5 µMol) durch Peroxydase (1,o ml) und Wasserstoffperoxyd (lo µMol) in Gegenwart von DHF in loo ml Puffer pH 6.

Die Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase, Wasserstoffperoxyd,Dihydroxyfumarsäure und Sauerstoff ist nach kurzer Zeit beendet. Nach zwei- und vierundzwanzigstündiger Reaktionszeit wurden Werte erhalten, die unter

Berücksichtigung der Genauigkeit der Methode als übereinstimmend anzusehen sind. (Tab. 12).
Wird die Gesamtmenge an zugesetzter Dihydroxyfumarsäure in fünf Portionen geteilt und nach und nach innerhalb von 3o Minuten zur Reaktionslösung gegeben, so resultieren geringere Anthrachinonausbeuten als bei sofortigem vollständigen Zusatz bei Reaktionsbeginn (Tab.12).

RA [mg]	H_2O_2 [µMol]	P [ml]	DHF [µMol]	Zeit [h]	Extinktion 38o [nm]	43o	RD [mg]	R [mg]	%R
1,38	25	1,o	5	2	o,437	o,16o	1,13	o,21	14,5
1,29	25	1,o	1o	2	o,355	o,171	o,98	o,28	2o,6
1,29	25	1,o	15	2	o,3o8	o,189	o,71	o,35	25,7
1,38	25	1,o	25	2	o,388	o,23o	o,9	o,42	28,9
1,3o6	1o	1,o	5	2	o,395	o,167	o,99	o,25	18,2
1,3o6	5o	1,o	25	2	o,352	o,236	o,79	o,46	33,5
1,3o6	1oo	1,o	5o	2	o,326	o,295	o,64	o,63	45,8
1,3o6	2oo	1,o	1oo	2	o,3o8	o,325	o,55	o,72	52,4
1,36	1o	1,o	5	24	o,431	o,165	1,1o5	o,226	15,8
1,36	5o	1,o	25	24	o,372	o,24o	o,84	o,458	32,o
1,36	1oo	1,o	5o	24	o,346	o,3o1	o,693	o,634	44,3
1,36	2oo	1,o	1oo	24	o,353	o,32o	o,692	o,684	47,6
1,34	1o	1,o	5x 1	2	o,4o1	o,157	1,o2	o,22	15,6
1,34	5o	1,o	5x 5	2	o,363	o,19o	o,88	o,33	23,4
1,34	1oo	1,o	5x1o	2	o,366	o,236	o,83	o,45	31,9
1,34	2oo	1,o	5x2o	2	o,3o6	o,274	o,6	o,58	41,1

Tab.12: Oxydation von Rheinanthron (RA) durch Peroxydase (P) und H_2O_2 in Gegenwart wechselnder Mengen von Dihydroxyfumarsäure (DHF) und H_2O_2 zu Rheindianthron (RD) und Rhein (R).

Bei der Autoxydation des Rheinanthrons hat der Zusatz von Mn-II-chlorid zur Reaktionslösung eine Herabsetzung des Anthrachinonanteils gegenüber der Dianthronausbeute zur Folge (Tab.7). Auch die Bildung von Rhein aus dem Rheinanthron durch Einwirkung des Systems Peroxydase-H_2O_2-Dihydroxyfumarsäure-O_2 wird durch Mn-II-chlorid gehemmt (Tab.13).
Geringe Rheinausbeuten werden auch erhalten, wenn die Dihydroxyfumarsäure durch Askorbinsäure ersetzt wird. Die Rheinwerte entsprechen dann etwa den Ausbeuten, die bei der Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd erhalten werden. (Tab.8 und 13).

RA [mg]	P [ml]	DHF [µMol]	$MnCl_2$ [µMol]	Extinktion 380 [nm]	430	RD [mg]	R [mg]	%R
1,5	1,0	5	5	0,515	0,127	1,402	0,082	5,2
1,5	1,0	50	5	0,510	0,127	1,385	0,084	5,3
1,5	1,0	50	50	0,530	0,125	1,45	0,069	4,4
		Askorb. [µMol]						
1,32	1,0	5		0,450	0,110	1,225	0,069	5,0
1,32	0,1	5		0,470	0,088	1,31	0	0

Tab.13: Oxydation von Rheinanthron (RA) durch Peroxydase (P) und jeweils 25 µMol H_2O_2 in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure (DHF) neben $MnCl_2$ bzw. in Gegenwart von Askorbinsäure zu Rheindianthron (RD) und Rhein (R) nach 2 Stunden.

Alle bisher in diesem Zusammenhang beschriebenen Versuche wurden bei pH 6 durchgeführt. Die Autoxydation des Rheinanthrons lieferte bei pH 7 mehr Anthrachinon als bei pH 6 (Tab.6).Daher erschien es interessant,die Rheinausbeuten zu ermitteln, die bei der Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase-H_2O_2-Dihydroxyfumarsäure-O_2

bei pH 7 erhalten werden. Es zeigte sich, daß die fermentative Oxydation des Rheinanthrons in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure bei pH 7 geringere Anthrachinonwerte ergab als bei pH 6 (Tab.14).

RA [mg]	H_2O_2 [µMol]	DHF [µMol]	pH	Extinktion 380 [nm]	430	RD [mg]	R	%R
1,3o6	1o	5	6	o,395	o,167	o,99	o,25	18,2
1,3o6	1oo	5o	6	o,326	o,295	o,64	o,63	45,8
1,3o6	2oo	1oo	6	o,3o8	o,325	o,55	o,72	52,4
1,41	1o	5	7	o,471	o,126	1,27	o,1o2	6,9
1,41	1oo	5o	7	o,424	o,211	1,o3	o,353	23,8
1,41	2oo	1oo	7	o,381	o,262	o,84	o,51	34,4

Tab.14: Oxydation des Rheinanthrons (RA) durch jeweils 1,o ml Peroxydaselsg. und H_2O_2 in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure (DHF) zu Rheindianthron (RD) und Rhein (R) bei pH 6 und 7 nach zwei Stunden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß ein System Peroxydase - Wasserstoffperoxyd - Dihydroxyfumarsäure - Sauerstoff in der Lage ist, bei der Oxydation des Rheinanthrons die Bildung des Anthrachinonderivates Rhein zu fördern. Die Oxydation des Anthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd liefert dagegen vorwiegend Rheindianthron. Die Größe der Rheinausbeute ist abhängig von der Peroxydase- und der Dihydroxyfumarsäurekonzentration, in begrenztem Umfang auch von der Wasserstoffperoxydmenge. Weiter ist die Anwesenheit von Sauerstoff erforderlich. Katalase und Mn-II-chlorid hemmen die Anthrachinonbildung. Askorbinsäure ist nicht imstande, die Dihydroxyfumarsäure in diesem System zu ersetzen. Für die Bildung des Rheins durch das hydroxylierende Fermentsystem erweist sich pH 6 günstiger als pH 7.

Reaktion des Rheindianthrons mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd

Für die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse war es wichtig zu wissen, ob das bei der Oxydation des Rheinanthrons gebildete Rheindianthron einem weiteren Angriff durch die Peroxydase unterliegt und ob dabei Rhein oder andere Produkte gebildet werden.
Zur Untersuchung dieser Frage wurde die gleiche Arbeitsweise wie bei der Oxydation des Rheinanthrons gewählt. Das eingewogene Rheindianthron wurde in 1 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit Puffer pH 6 versetzt und Peroxydase und Wasserstoffperoxyd zugegeben. Schließlich wurde auf 100,0 ml aufgefüllt. Das dunkel gestellte Gemisch wurde in wenigen Stunden langsam bräunlich. Bei Anwesenheit von Peroxydase war die Braunfärbung stärker als ohne Ferment. Wurde zusätzlich noch Dihydroxyfumarsäure zugefügt, trat ebenfalls Bräunung auf. Papierchromatogramme von nach vier Stunden Reaktionszeit erhaltenen Butylazetatextrakten zeigten außer dem Rheindianthronfleck am Startpunkt zurückbleibende braune Substanzen.
Die bei 380 und 430 nm erhaltenen Extinktionen (Tab.15) zeigen, daß Rhein bei der fermentativen Oxydation und bei der Autoxydation des Rheindianthrons bei pH 6 nicht gebildet wird. Mit Hilfe der Papierchromatographie konnte dies bestätigt werden. Dafür treten andere Dehydrierungsprodukte auf. Diese werden zwar auch bei der Autoxydation gebildet, doch ist die Bildungsgeschwindigkeit bei Anwesenheit von Peroxydase und Wasserstoffperoxyd größer, was besonders bei größeren Fermentkonzentrationen bemerkbar ist.
Zu weiteren Versuchen wurde Rheinanthron mit 0,1 ml Peroxydaselösung und Wasserstoffperoxyd bei pH 6 oxydiert. Unter diesen Reaktionsbedingungen bildet sich hauptsächlich Rheindianthron (Tab.8) neben wenig Rhein. Wurde nach zweistündiger Reaktionszeit zu der hellgelben Lösung

nochmals H_2O_2 und 1,o ml Peroxydaselösung gegeben, so färbte sich das Gemisch langsam braun. Bei Zufügung von nur o,1 ml Fermentlösung trat keine Braunfärbung auf, aber auch der Rheingehalt der Lösung war nach 24 Stunden nicht gestiegen. (Tab.15).

Auf Grund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, daß Rheindianthron durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd (auch in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure) nicht zum Rhein oxydiert wird. Die Oxydation des Rheindianthrons führt hier zu braunen, nicht näher identifizierten Folgeprodukten, die durchaus mit denen identisch sein können, die bei der Oxydation des Rheinanthrons gefunden werden.

1) RD [mg]	H_2O_2 [µMol]	P [ml]	DHF [µMol]	Zeit [h]	Extinktion 38o [nm]	Extinktion 43o	RD [mg]	R [mg]
1,38	o	o	o	o	o,486	o,o91	1,366	o
1,38	o	o	o	4	o,46o	o,o96	wenig br.Pr.	
1,38	25	1,o	o	4	o,435	o,o89	deutl.br.Pr.	
1,32	25	1,o	5o	4	o,368	o,o68	viel br.Pr.	
2) RA mg								
1,28	1o	o,1	o	2	o,452	o,o89	1,255	o,o15
1,28	1o+25	o,1+o,1	o	2+24	o,448	o,o84	1,245	o,o11
1,28	1o+25	o,1+1,o	o	2+24	o,374	o,o78	viel br.Prod.	
1,28	1o+25	o,1+1,o	o+5o	2+24	o,32o	o,o86	viel br.Prod.	

Tab.15: 1) Oxydation des Rheindianthrons (RD) mit Peroxydase (P), H_2O_2 und Dihydroxyfumarsäure (DHF
2) Oxydation des Rheinanthrons (RA) zum Dianthron mit Peroxydase (P) und H_2O_2 und weitere Reaktion des gebildeten Rheindianthrons mit Peroxydase, H_2O_2 und Dihydroxyfumarsäure (DHF). Nicht identifizierte braune Produkte = br.Pr.

Einwirkung von Peroxydase und Wasserstoffperoxyd auf Sennosid A

Um Auskunft darüber zu erhalten, ob ein 8,8'-Diglukosid des Rheindianthrons, das Sennosid A, gegen eine fermentative Oxydation stabiler ist als das Aglykon, wurde Sennosid A bei pH 6 einer Einwirkung durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd über 24 Stunden ausgesetzt.

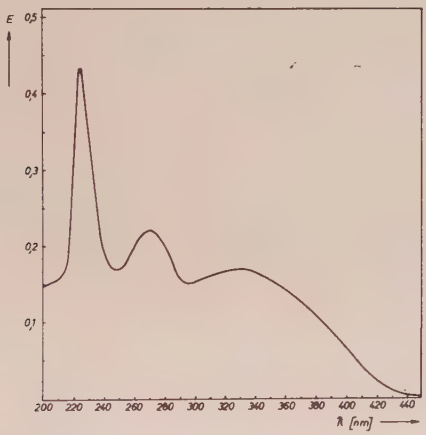


Abb. 13: Absorptionsspektrum von 1,oo mg Sennosid A in loo,o ml o,o5 m Zitronensäure-Phosphat-Puffer vom pH 6.(Absorptionsmaxima bei 225,271,333-335 nm).

Eine spektrophotometrische Untersuchung wurde durch den Vergleich der Absorptionsspektren des Sennosids A vor und nach der Peroxydaseeinwirkung verschiedener Fermentmengen über 2 und 24 Stunden vorgenommen. Da die Extinktionen nur in kleinen Grenzen schwankten, konnte geschlossen werden, daß das Sennosid A durch Peroxydase-H_2O_2 nicht angegriffen wird. Tabelle 16 gibt die Meßergebnisse bei einigen Wellenlängen wieder. Danach sind die Spektren aller Reaktionsansätze praktisch identisch.

Nach 24stündiger Einwirkung von Peroxydase und Wasserstoffperoxyd auf Sennosid A wurden je 1,o ml der bei Tabelle 16 angegebenen Gemische auf Schleicher- und -Schüll-Papier 2o43 bM, 58 x 16 cm, aufgetragen und nach 5stündiger Sättigung absteigend mit der Oberphase von n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 (v/v/v) über 18 Stunden auf einer Laufstrecke von ca. 4o cm in einer Glaskammer (12) chromatographiert.
In allen Fällen konnte nur ein Fleck von Sennosid A (Rf o,4 - o,5), der im UV-Licht orange fluoreszierte und mit methanolischer Kalilauge eine Gelbfärbung ergab, beobachtet werden.

Mit Hilfe der genannten Methoden konnten weder braune Reaktionsprodukte noch Anthrachinonglukoside nachgewiesen werden. Auch gegen Autoxydation waren Lösungen von Sennosid A vom pH 6 stabil (Tab.16).

λ [nm]	1	2	3	4	5	6
22o	1,2o1	1,161	1,161	1,167	1,149	1,155
225	1,854	1,78o	1,824	1,824	1,824	1,824
23o	1,456	1,456	1,444	1,456	1,469	1,456
25o	o,721	o,721	o,719	o,721	o,717	o,717
26o	o,839	o,839	o,837	o,837	o,833	o,83o
27o	o,951	o,947	o,939	o,943	o,943	o,943
28o	o,851	o,848	o,842	o,845	o,842	o,845
3oo	o,656	o,654	o,652	o,652	o,654	o,652
32o	o,717	o,714	o,71o	o,7o7	o,712	o,7o7
333/5	o,728	o,726	o,721	o,721	o,719	o,719
35o	o,658	o,656	o,652	o,654	o,654	o,656
38o	o,47o	o,465	o,459	o,463	o,462	o,461
43o	o,o5o	o,o51	o,o4o	o,o43	o,o42	o,o4o
5oo	o,olo	o,oo9	o,oo4	o,oo8	o,oo5	o,oo6

Tab.16: Extinktionen der Gemische 1 - 6 bei verschiedenen Wellenlängen.

1 = 4,28 mg (ca. 5 µMol) Sennosid A in loo,o ml o,o5 m Puffer pH 6 sofort nach der Auflösung.

2 = Gemisch 1 nach 24 Stunden

3 = Gemisch 1 nach zweistündiger Einwirkung von 25 µMol Wasserstoffperoxyd und o,1 ml Peroxydaselösung.

4 = Gemisch 3 nach 24stündiger Einwirkung

5 = Gemisch 1 nach zweistündiger Einwirkung von 25 µMol Wasserstoffperoxyd und 1,o ml Peroxydaselösung.

6 = Gemisch 5 nach 24stündiger Einwirkung.

Als Blindlösung diente jeweils der gleiche Reaktionsansatz unter Fortlassung des Sennosids A.

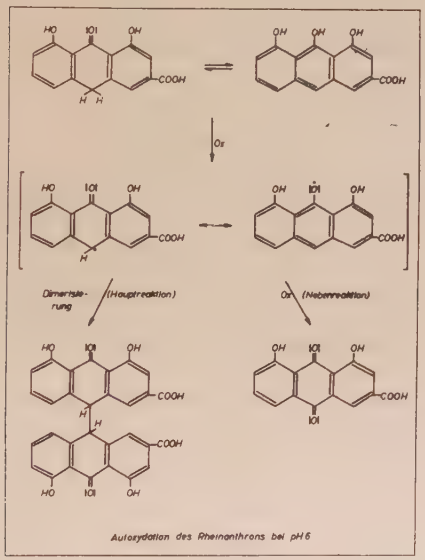
DISKUSSION

Bei der Suche nach dem Mechanismus der Oxydation eines Anthronderivates innerhalb eines biologischen Systems muß man verschiedene Möglichkeiten in Betracht ziehen. Es können sowohl von Pflanzenart zu Pflanzenart als auch zwischen lebenden und toten pflanzlichen Organismen unterschiedliche Reaktionen ablaufen. Die Vielfalt der in der Natur aufgefundenen Anthraderivate erlaubt den Schluß, daß die Oxydation von Anthronen, die wahrscheinlich als ursprüngliche Anthracenabkömmlinge in der Pflanze angesehen werden können (36), zu verschiedenen Oxydationsprodukten führen kann. Man weiß, daß bei der Lagerung der Frangularinde die zunächst überwiegend vorhandenen Anthrone mindestens teilweise in Anthrachinone übergeführt werden. H.BROCKMANN und H.EGGERS (7) zeigten aber, daß Emodinanthron auch als Vorstufe des Mesonaphthodianthrons Hypericin und anderer Dimerer des Emodianthrons, z.B. des Penicilliopsins, dienen kann. Erwähnt man noch die aus Sennesblättern erhaltenen Sennoside, die Dianthronderivate des Rheins darstellen, so sind damit die Verbindungstypen, die bei der Oxydation von Anthronderivaten erwartet werden können, genannt.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß auch das Rheinanthron in vitro in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen zu verschiedenen Produkten oxydiert werden kann. Als Oxydationsprodukte treten die Anthrachinon- und die Dianthronstufe, die dann noch weiter zu bisher nicht näher identifizierten, braunen Substanzen oxydiert werden kann, auf. Je nach den Reaktionsbedingungen schwankt die quantitative Zusammensetzung des Gemisches der Oxydationsprodukte.

Bei der Autoxydation in wässeriger Lösung unter Vermeidung extremer, unphysiologischer pH-Werte werden Rheindianthron und Rhein als Oxydationsprodukte des Rheinanthron

gefunden (Tab.6 und 7). Für die Bildung des Hauptproduktes Rheindianthron ist nach allgemeinen Auffassungen über Autoxydationsvorgänge (2o) folgender Reaktionsverlauf wahrscheinlich:



Autoxydation des Rheinanthrons bei pH 6

Ob der Angriff des Sauerstoffs am Anthron oder am tautomeren Anthranol erfolgt, kann nach den vorliegenden Ergebnissen nicht entschieden werden. Die Möglichkeit der Oxydation des Anthranols ist aber zu berücksichtigen, zumal es besonders oxydationsempfindlich ist.(35). Das Anthron-Anthranol-Gleichgewicht ist pH-abhängig und liegt bei pH 6 wohl stark auf der Anthronseite.
Das bei der Oxydation als Zwischenstufe entstehende Rheinanthronradikal ist in mehreren mesomeren Strukturen denkbar. Offensichtlich ist die Struktur, die zum Dianthron führt, gegenüber den anderen begünstigt, was durch das Endprodukt selbst bestätigt wird. Andere dimere Verbindun-

gen als das Rheindianthron treten bei der Reaktion nicht auf.
Neben Rheindianthron wird in allen untersuchten Fällen auch Rhein als Endprodukt der Autoxydation des Rheinanthrons gefunden. Über den Mechanismus dieser Reaktion kann wenig ausgesagt werden, da die gewonnenen Ergebnisse darüber keinen Schluß zulassen. Die Oxydation zum Anthrachinon könnte über radikalische oder kationische Zwischenstufen direkt oder durch Disproportionierung erreicht werden. Eine Entscheidung für einen bestimmten Mechanismus ist bisher nicht möglich. Die erhöhte Anthrachinonbildung bei der Autoxydation im alkalischen Bereich läßt das Auftreten einer kationischen Zwischenstufe, die in der Lage wäre, mit OH-Ionen in die Anthrahydrochinonstufe überzugehen, möglich erscheinen. Diese Verbindung ist sehr oxydationsempfindlich. Durch Dehydrierung wird Rhein gebildet. Experimentell ist diese hypothetische Reaktionsfolge aber nicht untermauert.

Die Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd führt bei Luftzutritt ebenfalls zu Rheindianthron und Rhein. Die Rheinkonzentrationen bleiben aber geringer als bei der Autoxydation. Unter Ausschluß des Luftsauerstoffs wird fast nur Rheindianthron gefunden (Tab.8 und 10). Daraus kann geschlossen werden, daß die Fermentreaktion die Dianthronbildung sehr begünstigt. Unter gewissen Reaktionsbedingungen werden daneben aber noch braune Substanzen gefunden, die auch unter Peroxydaseeinfluß aus dem Dianthron gebildet werden (Tab.8, 9 und 15).
Auch für die fermentative Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd kann ein Radikalmechanismus angenommen werden. Dabei greift der Peroxydase-Wasserstoffperoxyd-Komplex an einer phenolischen OH-Gruppe an und oxydiert das Anthron bzw. Anthranol in einer "Ein-Elektron-Reaktion" zum

Rheinanthronradikal. Die Dimerisierung erfolgt wieder über dessen am meisten begünstigte mesomere Grenzstruktur. Aus der Literatur (59) ist bekannt, daß eine Reaktion von Peroxydase-Wasserstoffperoxydkomplexen mit Radikalen wenig wahrscheinlich ist. Deshalb erscheint es kaum möglich, daß dieses System eine Oxydation des Rheinanthrons bis zur Anthrachinonstufe katalysiert, was auch durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt wird. Im Stickstoffstrom wird bei der Fermentreaktion praktisch kein Rhein gebildet (Tab.1o). So kann die Bildung des Rheins während einer fermentativen Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd bei Luftzutritt nur auf einen parallel zur Fermentreaktion verlaufenden Autoxydationsvorgang zurückgeführt werden. Das gebildete Rheinanthronradikal wird zum Anthrachinon oxydiert und an der Dimerisierung gehindert.
In die Vermutungen über den Ablauf solcher Fermentreaktionen läßt sich die Tatsache, daß bei höheren Peroxydasekonzentrationen höhere Rheinwerte gefunden werden (Tab.8), nicht recht einordnen. Danach sind diese Ergebnisse so zu interpretieren, daß die Erhöhung der Extinktion bei 43o nm mit Steigerung der Fermentmenge nicht auf einen steigenden Rheingehalt, sondern auf die durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd geförderte Bildung brauner Folgeprodukte des Rheindianthrons zurückzuführen ist (Tab. 8 und 15). Diese Stoffe, die zum Teil mit Butylazetat ausschüttelbar sind, können durch ihre Absorption im Bereich von 38o bis 43o nm das Ergebnis verfälschen, auch wenn ihr chromatographischer Nachweis wegen zu geringer Konzentration noch nicht möglich ist. Über die Vorgänge, die bei der Oxydation des Rheinanthrons über das Rheindianthron hinaus ablaufen, kann hier nicht diskutiert werden, da noch keine Hinweise für die Struktur der entstehenden Verbindungen vorliegen.

Ein beträchtliches Interesse beansprucht die Oxydation des Rheinanthrons mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd

in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure und Sauerstoff. Mehrfach ist in den letzten Jahren über Hydroxylierungen von aromatischen Verbindungen durch das System Peroxydase-Dihydroxyfumarsäure-Sauerstoff berichtet worden (1o,32,33,34). Die Untersuchungen von H.S.MASON und Mitarbeitern führten schließlich zur Annahme eines Radikalmechanismus, nachdem lange die Möglichkeit eines elektrophilen Angriffs auf das aromatische Substrat diskutiert worden war. J.YAMAZAKI (59) konnte ein Radikal der Dihydroxyfumarsäure bei der Reaktion mit Peroxydase und H_2O_2 nachweisen. D.BUHLER und H.S.MASON (1o) diskutieren den Mechanismus der aromatischen Hydroxylierung wie folgt: Die Oxydation der Dihydroxyfumarsäure wird durch Peroxydase mit Wasserstoffperoxydspuren eingeleitet und in einer "Oxydasereaktion" der Peroxydase bei Anwesenheit von Sauerstoff als Kettenreaktion fortgeführt. Den dabei als Reduktionsprodukt des Sauerstoffs auftretenden Perhydroxylradikalen schreiben die Autoren die hydroxylierende Wirkung auf aromatische Verbindungen zu.
In Analogie hierzu kann die vermehrte Bildung von Rhein bei der Oxydation des Anthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure und Sauerstoff erklärt werden.
Die eigenen Versuche ergeben, daß sowohl Sauerstoff als auch Wasserstoffperoxyd für diese Reaktion erforderlich sind. Unter anaeroben Bedingungen ist auch bei Anwesenheit von H_2O_2 keine hohe Rheinkonzentration zu erzielen (Tab.1o). Andererseits ist aber auch in Gegenwart von Sauerstoff eine gewisse Wasserstoffperoxydmenge notwendig, um eine möglichst starke Hydroxylierung des Rheinanthrons durch das hydroxylierende System zu erreichen (Tab.1o,Abb.11). Bei den von H.S.MASON u.a. beschriebenen Reaktionen war eine Hydroxylierung unabhängig von Wasserstoffperoxyd.

Die Hydroxylierung des Rheinanthrons in Gegenwart von H_2O_2 im Überschuß ist aber auch merklich größer als sie H.S.MASON bei verschiedenen aromatischen Verbindungen ohne

Wasserstoffperoxyd erreichte.

Bei sofortigem starken Angebot von hydroxylierendem Agens zu Beginn der fermentativen Oxydation wird eine höhere Rheinausbeute erzielt als bei verzögerter Zugabe der gleichen Menge Dihydroxyfumarsäure (Tab.12). Diese Tatsache kann zweifach gedeutet werden. Einmal kann sie auf eine Hydroxylierung des Anthrons- bzw. Anthranols zum Anthrahydrochinon hinweisen, das dann einer Dehydrierung zum Anthrachinon auf fermentativem oder autoxydativem Wege zugänglich ist. Daraus erklärt sich eine hohe Rheinausbeute bei großem Angebot von Dihydroxyfumarsäure zu Reaktionsbeginn. Diese Reaktionsfolge würde dem von D.BUHLER und H.S.MASON diskutierten Hydroxylierungsschema entsprechen. Andererseits ist es denkbar, daß erst das durch eine fermentative Oxydation gebildete Rheinanthronradikal einer Hydroxylierung unterliegt. Da in der beschriebenen Reaktion Rhein und Rheindianthron als Oxydationsprodukte des Rheinanthrons auftreten, andere Hydroxylierungsprodukte aber nicht gefunden werden, tritt nur eine Hydroxylierung der Mesoposition des Anthrons ein. Verliefe die Reaktion analog der Hydroxylierung der von D.BUHLER und H.S.MASON untersuchten Aromaten, wäre eine Anzahl verschiedener Hydroxylierungsprodukte des Rheinanthrons zu erwarten. Die Bevorzugung der Mesoposition könnte ein Zeichen dafür sein, daß nur das besonders reaktionsfähige Rheinanthronradikal einer Hydroxylierung durch das Peroxydase - Dihydroxyfumarsäure - System unterliegt. Bei geringerem Angebot an hydroxylierendem Agens zu Reaktionsbeginn ergibt sich dann eine verstärkte Dimerisierung des Rheinanthronradikals zum Rheindianthron, wodurch die Rheinausbeute abnimmt.

Mn-II-chlorid hemmt die Rheinbildung bei der Oxydation des Rheinanthrons mit Peroxydase, Wasserstoffperoxyd, Dihydroxyfumarsäure und Sauerstoff (Tab.13). Auch bei der Autoxydation wird eine geringere Rheinausbeute bei An-

wesenheit von Mn-II-chlorid beobachtet (Tab.7). Mn-(II) hemmt dabei nur die Hydroxylierungsreaktion, nicht aber die Bildung des Dianthrons. Es ergibt sich weiter, daß für eine Hydroxylierung des Rheinanthrons durch das Peroxydase-System pH 6 günstiger ist als pH 7. (Tab.14). Askorbinsäure ist nicht in der Lage, die Dihydroxyfumarsäure im hydroxylierenden System zu ersetzen.(Tab.13). Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben von D.BUHLER und H.S.MASON überein, die diese Autoren bei der Hydroxylierung von verschiedenen aromatischen Substraten machen. Ein Anthracenderivat ist von ihnen nicht untersucht worden.

Die diskutierten In-vitro-Versuche, die zur Beschreibung einer fermentativen Oxydation des Rheinanthrons bei pH 6 durchgeführt wurden, lassen sich wie folgt zusammenfassen: Rheinanthron reagiert mit Peroxydase und Wasserstoffperoxyd unter Ausbildung von Rheinanthronradikalen, aus denen zum geringem Teil durch Autoxydation Rhein gebildet wird, während der überwiegende Teil zum Rheindianthron dimerisiert. Wird die Reaktion aber in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure und Sauerstoff ausgeführt, so nehmen die von diesem System gebildeten Perhydroxylradikale (1o) oder ein anderes hydroxylierendes Agens an der Reaktion teil. Hierdurch wird eine höhere Rheinausbeute erzielt.

Wenn man von der Voraussetzung ausgeht, daß Rheinanthron oder seine Glykoside als reduzierte Vorstufen der im Pflanzenreich aufgefundenen entsprechenden Oxydationsprodukte anzusehen sind, so haben diese Versuche gezeigt, daß der Verlauf solcher Oxydationen von verschiedenen Faktoren abhängt. Es sei daran erinnert, daß in Rhabarberwurzeln Anthrachinon-, in Sennesblättern dagegen fast ausschließlich Dianthronderivate als Oxydationsprodukte des Rheinanthrons gefunden werden. Dazu kommt noch die Frage, ob der jeweilige Oxydationsvorgang in der lebenden Pflanze oder postmortal abläuft, was wiederum unterschiedliche

Endergebnisse zur Folge haben kann. Außer den besprochenen Fermentreaktionen und autoxydativen Prozessen können auch andere oxydierende Enzyme eine Rolle spielen. Nach den vorliegenden Versuchen erscheint es möglich, daß bei solchen Oxydationen eine Peroxydase beteiligt ist, doch wäre die Bildung des Rheins von Cofaktoren, wie sie hier in Form eines Endiols vorliegen, abhängig, da bei Abwesenheit der Dihydroxyfumarsäure hauptsächlich Rheindianthron und andere Dehydrierungsprodukte in Form brauner Niederschläge resultieren. Während Rheindianthron einer Oxydation durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd unterliegt, ist das Sennosid A durch die Glykosidierung so stabilisiert, daß eine Reaktion mit der Peroxydase nicht eintritt (Tab.15 und 16).

Die von H.BROCKMANN (7) für möglich gehaltenen Umsetzungen des Emodinanthrons in der Pflanze zu Hypericin bzw. Penicilliopsin deuten auf weitere Dimerisierungsmöglichkeiten von Anthronen innerhalb pflanzlicher Individuen. Hier ist zu berücksichtigen, welche Einflüsse Substituenten am Anthracengerüst wie α - und β-ständige Hydroxyle, Carboxyl- und andere funktionelle Gruppen auf derartige Reaktionen auszuüben vermögen. Schließlich bleibt zu überprüfen, inwieweit solche Modellversuche auf den Pflanzenorganismus übertragen werden können.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeit befaßt sich mit der Oxydation des Rheinanthrons, einer 1,8-Dihydroxyanthron-3-carbonsäure.
Mit Hilfe der Papier- und der Dünnschichtchromatographie und durch spektrophotometrische Bestimmungen können Rheindianthron und Rhein mit unterschiedlichen Ausbeuten als Produkte der Oxydation des Rheinanthrons unter verschiedenen Reaktionsbedingungen identifiziert werden.

Im pH-Bereich 6 - 10 unterliegt das Rheinanthron einer starken Autoxydation. Diese führt hauptsächlich zum Dianthron und in geringerem Maße zum Anthrachinon. Mit steigendem pH nimmt die Neigung zur Rheinbildung zu. Parallel dazu zeigt das durch Autoxydation gebildete Rheindianthron die Tendenz, in braune, noch unbekannte Folgeprodukte überzugehen.
Auch die Oxydation des Rheinanthrons durch Meerrettichperoxydase und Wasserstoffperoxyd liefert bei Gegenwart von Luftsauerstoff Rheindianthron und Rhein. Doch machen die Versuche wahrscheinlich, daß die fermentative Oxydation unter Luftabschluß praktisch ausschließlich zum Dianthron führt. Bei Sauerstoffzutritt bleibt die Anthrachinonausbeute aus der Fermentreaktion in allen Fällen kleiner als bei der Autoxydation. Das teilweise verstärkte Auftreten brauner Dehydrierungsprodukte bei der Oxydation des Rheinanthrons durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd und bei der Reaktion von Rheindianthron mit diesem Fermentsystem läßt die Vermutung zu, daß die Peroxydase die Bildung der genannten braunen Verbindungen begünstigt.
Zur Erreichung größerer Rheinausbeuten bei einer peroxydasekatalysierten Oxydation des Rheinanthrons sind dagegen bestimmte Cofaktoren notwendig.
Die Anwesenheit von o-Diphenolen neben Rheinanthron als Reaktionspartner der Peroxydase-Wasserstoffperoxyd-Komplexe führt nicht in verstärktem Maße zur Anthrachinonstufe, sondern zur Bildung brauner Polymerer des Rheinanthrons.

Eine starke Neigung zur Oxydation des Rheinanthrons zum Rhein durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd besteht in Gegenwart von Dihydroxyfumarsäure und Sauerstoff. In Abhängigkeit von der Konzentration der Dihydroxyfumarsäure können bis zu 5o % des eingesetzten Rheinanthrons in Rhein übergeführt werden, während die Autoxydation beim gleichen pH-Wert (pH 6) etwa 15 % Rhein liefert.
Es wird versucht, diese Vorgänge in Anlehnung an einen von D.BUHLER und H.S.MASON (1o) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus zur Hydroxylierung aromatischer Verbindungen zu deuten.
Besonders stabil gegen einen Angriff der Peroxydase ist das dimere Glukosid Sennosid A, das im Gegensatz zum Rheindianthron keine Veränderung durch das Fermentsystem erleidet und bei pH 6 auch keiner Autoxydation unterliegt.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Auerbach, M.E., J. Amer.pharmac.Assoc.sci.Edit. 34,31o (1945)
2) Auterhoff,H., Arzneimittel-Forsch. 1,412 (1951)
3) Auterhoff,H., Planta med. 1,97 (1953)
4) Auterhoff,H.,F.C.Scherff, Arch.Pharmaz. 293,918 (196o)
5) Bellaart,A.C., Dissertation Groningen 1952
6) Bridel,M.,C.Charaux, Bull.Soc.Chim.biol. 15,648 (1933)
7) Brockmann,H.,H.Eggers, Chem.Ber. 91,547 (1958)
8) Brockmann,H.,E.H.von Falkenhausen,R.Neeff,A.Dorlars, G.Budde,Chem.Ber. 84,865 (1951)
9) Brockmann,H.,F.Kluge,H.Muxfeldt,Chem.Ber. 9o,23o2 (1957)
1o) Buhler,D.,H.S.Mason, Arch.Biochem.Biophysics 92, 424 (1961)
11) Chance,B., Advances in Enzymology 12,153 (1951)
12) Cramer,F., Papierchromatographie,4.Aufl. S.48,Abb.25 (Weinheim 1958)
13) Crellin,J.K.,J.W.Fairbairn,C.A.Friedmann,H.A.Ryan, J.Pharmacy Pharmacol. 13,639 (1961)
14) Cross,E.J.,A.G.Perkin,J.chem.Soc.(London) 193o, 292
15) D-Ans.J.,E.Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Berlin 1949
16) Devlin,T.M.,zitiert in "Methods in Enzymology", Academic Press,New York,Vol. 2,77o (1955)
17) Dimroth,O.,Ber.dtsch.chem.Ges. 34,223 (19o1)
18) Faustmann,B., Dissertation Berlin 1961
19) Fenton, J.chem.Soc. (London) 65,9o2
2o) Gould,E.S., Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie,Weinheim/Bergstraße 1962, S.858
21) Hartree,E.F., J.Amer.chem.Soc. 75,6244 (1953)
22) Hermann,K.,Lebensmittel-Unters.Forsch. 1o8,152 (1958)
23) Hesse,O.,Liebigs Ann.Chem. 3o9,32 (1899)
24) Hörhammer,L.,H.Wagner,I.Köhler, Arch.Pharmaz. 292, 592 (1959)
25) Hörhammer,L.,H.Wagner,H.J.Leue, Dtsch.Apotheker Ztg. 99, 1o43 (1959)

26) Ippen,H.,T.Montag, Arzneimittelforsch. 8, 778 (1958)
27) Jacob,M., Dissertation Bern 1954
28) Kariyone,T.,K.Tsukida, J.pharmac.Soc.Japan 74, 232 (1954)
29) Köhler,I., Dissertation München 1958
3o) Kortüm,G.,W.Theilacker,E.Elliehausen, Chem.Ber. 86, 294 (1953)
31) Lipinski,B., Acta polon.pharmac. 16, 467 (1959)
32) Mason,H.S., in Advances in Enzymology 19, 79 (1957)
33) Mason,H.S.,I.Onopryenko,D.Buhler,Biochim.biophysica Acta 24, 225 (1957)
34) Mason,H.S.,I.Onopryenko,K.Yasunobu,D.Buhler, J.Amer,chem.Soc. 79, 5578 (1957)
35) Meyer,K.H., Liebigs Ann.Chem. 379, 37 ff. (1911)
36) Mühlemann,H., Festschrift P.Casparis, Schw.Apotheker-Verein 1949
37) Nawa, H.,M.Ushibayashi,T.Matsuoka, J.org.Chemistry 26, 979 (1961)
38) Oesterle, O.A., Arch.Pharmaz. 25o, 3oo (1912)
39) Robinson,R.,J.L.Simonsen, J.chem.Soc. (London) 95, 1o85 (19o9)
4o) Saunders,B.C., Royal Inst.Chem. (London), Lectures, Monographs, and Reports Nr. 1, 559 (1957)
41) Schenck,G.,H.Loth,F.D.Feyen, Arch.Pharmaz. 29o, 292 (1957)
42) Scherff,F.C., Dissertation Braunschweig 196o
43) Schindler,O., Pharmac.Acta Helvetiae 21, 189 (1946)
44) Schmid,W., Dtsch.Apotheker-Ztg. 91, 452 (1951)
45) Schmid,W., Arzneimittelforsch. 2, 6 (1952)
46) Scholl,R.,J.Mansfeld, Ber.dtsch.chem.Ges. 43, 1734 (191o)
47) Schultz,O.E., Pharmazie 5, 546 (195o)
48) Serger,P., Dissertation Dresden 196o
49) Stahl,E.,P.J.Schorn,Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 325, 263 (1961)
5o) Steiner,M. in Methoden der Fermentforschung, Bd. I 761 (1941)

51) Stoll,A.,Verh.Schw.Naturforsch.Ges. 1941, 235
52) Stoll,A.,B.Becker,A.Helfenstein, Helv.chim.Acta 33, 313 (1950)
53) Stoll,A.,B.Becker,W.Kußmaul, Helv.chim.Acta 32, 1892 (1949)
54) Theorell,H.,B.Swedin, Naturwissenschaften 27, 95 (1939)
55) Tsukida,K., J.pharmac.Soc.Japan 74, 1089 (1954)
56) Tsukida,K., Planta med. 5, 97 (1957)
57) Wasicky,R., Ber.dtsch.bot.Ges. 33, 37 (1915)
58) Wasicky,R.,B.Heinz, Pharmaz.Mh. 5, 249 (1924)
59) Yamazaki,I.,H.S.Mason,L.Piette, J.biol.Chemistry 235, 2444 (1960)
60) Chromatographie mit Aluminiumoxyden "Woelm", 2.Aufl.,S.11 (1958)

Lebenslauf
==========

Am 14.Oktober 1934 wurde ich Kurt Paul Matthias Koßmann, als Sohn des Apothekers Hans-Jochen Koßmann und seiner Ehefrau Christine geb. Siehr in Berlin geboren. Das Abitur bestand ich im Juni 1952 an der Schinkelschule in Berlin-Prenzlauer Berg. Am 1. Oktober 1953 begann ich meine Praktikantenzeit in der Mohlenhof-Apotheke in Hamburg. Im Herbst 1955 bestand ich dort das Vorexamen. Von November 1955 bis Oktober 1958 absolvierte ich ein sechssemestriges Pharmaziestudium an der Freien Universität Berlin, das ich im November 1958 mit bestandenem Staatsexamen abschloß. Nach achtmonatiger Kandidatenzeit in der Brunhild-Apotheke in Berlin-Schöneberg begann ich meine Doktorarbeit bei Professor Dr.Gerhard Schenck am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität. Sie wurde später unter der Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Loth fortgeführt. Am 1. Januar 1960 erhielt ich die Bestallung als Apotheker. Seit Mai 1960 bin ich mit der Wahrnehmung der Geschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin beauftragt.

Xerografie-Druck:
Chemoprint oHG.
Gießen